



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-graduação em Biologia Animal



CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE UMA FOSFOLIPASE TIPO A₂ ISOLADA DA SECREÇÃO CUTÂNEA DO ANURO *Pithecopus azureus* (*PHYLLOMEDUSA AZUREA*)

Discente: Andréia Camargo Pinheiro

Trabalho de Dissertação apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal da Universidade de
Brasília, como requisito parcial para a
obtenção do título de mestre em
Biologia Animal.

Orientador: Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Co-orientadora: Dra. Eliane Noronha

2016

Dedicatória

Aos meus filhos, Felipe e Arthur, por entenderem a minha ausência. Ao meu marido Leandro, pelo incentivo e apoio, dedico-lhes este trabalho!

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu marido Leandro, por ter me ajudado a tomar a decisão de fazer esse mestrado, por todo apoio, suporte e paciência. Aos meus filhos Felipe e Arthur, que muitas vezes sentiram minha ausência como mãe.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior pela confiança, incentivo e orientação durante a realização deste trabalho. Agradeço muito por ter me aceito quando “bati em sua porta”.

Aos professores Dra. Mariana S. Castro, Dr. Wagner Fontes, Dra. Eliane Noronha e Dra. Sonia Maria de Freitas, pelas orientações e colaborações para realização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos Professores da UFRJ Dr. Gilberto Domont e Dr. Rafael Donadeli Melani pelo acesso e realização do sequenciamento de *novo* no equipamento LTQ Velos Orbitrap Thermo Scientific.

Meus sinceros agradecimentos a minha amiga Tânia Barth pela grande ajuda e acolhimento nos momentos os quais me senti mais perdida, e, principalmente, por tornar os momentos no laboratório agradáveis e descontraídos. Muito obrigada!

Aos amigos e colegas de laboratório Ana Carolina, Carlos Santana e Lucas Ferreira, pela ajuda, ensinamentos e incentivo desde o início do meu trabalho.

Aos meus queridos estagiários Bruna Rangel, Jéssica Schneider e Gabriel Arcadepani pelas inúmeras cromatografias feitas. Não teria conseguido finalizar este trabalho sem vocês!

Aos colegas de outros laboratórios Amanda Souza, Alonso Poma, Brenda Rabello, Jaques, Hary, Gabriel, Solange, Carol, pelas valiosas ajudas e dicas!

Ao técnico Nuno, pela imensa paciência e por todo tempo gasto no MALDI para analisar minhas amostras.

Ao meu querido amigo Dr. Breno Adaid, por toda ajuda com as análises estatísticas.

Aos meus amigos do Crossfit Consciência pelo apoio, paciência, e por serem meus ombros amigos nos momentos que eu chegava cansada ou desanimada por algum ensaio que não deu certo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

Por último, gostaria de agradecer à Universidade de Brasília (UNB), em especial ao Instituto de Biologia (IB) por essa tão grande oportunidade.

SUMÁRIO

Lista de figuras	VIII
Lista de tabelas	X
Lista de abreviações	XI
Resumo	XII
Abstract.....	XIV

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anfíbios	1
1.2 Gênero <i>Phyllomedusa</i>	2
1.3 Fosfolipases	3

2. JUSTIFICATIVA 10

3. OBJETIVO GERAL 11

3.1 Objetivos específicos	11
---------------------------------	----

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da secreção cutânea	12
4.2 Purificação da enzima	12
4.2.1 Perfil cromatográfico	12
4.2.2 Perfil recromatográfico	12
4.2.3 Monitoramento das frações com atividade enzimática da fosfolipase	13
4.3 Caracterização enzimática	14
4.3.1 Atividade enzimática da fosfolipase	14
4.3.2 Análise de pH	15
4.3.3 Análise de temperatura	15
4.3.4 Cinética enzimática	15

4.4 Caracterização da estrutura primária por espectrometria de massa	16
4.4.1 Digestão da proteína	16
4.4.2 MALDI-TOF/TOF	16
4.4.3 LC – MS/MS	17
4.4.4 Análise de dados	18
4.4.4.1 Banco de dados	18
4.4.4.2 Processamento e análise de dados	18
4.5 Caracterização da estrutura secundária	19
4.5.1 Dosagem de proteína	19
4.5.2 Análise da estrutura secundária e estabilidade estrutural por dicroísmo circular	19
4.6 Ensaio biológico	20
4.7 Análises estatísticas	20

5. RESULTADOS

5.1 Identificação e purificação da fosfolipase	21
5.1.1 Perfil cromatográfico	21
5.1.2 Atividade fosfolipasica	22
5.1.3 Perfil recromatográfico	23
5.1.4 Tabela de purificação	24
5.2 Análise da estrutura primária	24
5.2.1 MALDI TOF/TOF	24
5.2.2 LC – MS/MS	25
5.2.2.1 Espectrograma de massa de alta precisão.....	25
5.2.2.2 Sequenciamento de Novo.....	26
5.3 Análise de estrutura secundária	28
5.4 Caracterização enzimática	30
5.4.1 Determinação da concentração da enzima e tempo ideais	30
5.4.2 Efeito do íon divalente sobre atividade fosfolipásica	31

5.4.3 Efeito do pH sobre atividade fosfolipásica.....	32
5.4.4 Efeito da temperatura sobre atividade fosfolipásica	33
5.4.5 Cinética enzimática	34
5.5 Ensaio biológico	35
6. DISCUSSÃO	36
6.1 Perfil cromatográfico	36
6.2 Análise da estrutura primária	38
6.3 Análise da estrutura secundária	40
6.4 Atividade fosfolipásica e cinética enzimática	41
6.5 Atividade biológica	44
7. CONCLUSÃO	47
8. PERSPECTIVAS	48
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécime adulto de <i>P. azureus</i>	3
Figura 2. Sítio de ação das fosfolipase sobre os glicerolfosfolipídeos	4
Figura 3. Classificação das PLA ₂ s	5
Figura 4. Produção de mediadores lipídicos pela PLA ₂	7
Figura 5. Cromatografia da secreção cutânea de <i>P. azureus</i>	21
Figura 6. Atividade fosfolipásica preliminar	22
Figura 7. Recromatografia da fração PA2	23
Figura 8. Espectrograma de massa da fração PA2.3	25
Figura 9. Espectro de massa de alta precisão da fração PA2.3 obtida por Orbitrap	26
Figura 10. Sequência de aminoácidos da fosfolipase (PA2.3) de <i>P. azureus</i> obtido pelo Peaks 7.0.	27
Figura 11. Comparação da sequência das PLA ₂ s com a proteína isolada da secreção cutânea de <i>P. azureus</i>	27
Figura 12. Efeito da temperatura na estrutura secundária e estabilidade estrutural da PA2.3 por dicroísmo circular	29

Figura 13. Concentração de proteína e tempo de atividade enzimática	30
Figura 14. Efeito do íon Ca^{2+} sobre atividade fosfolipásica	31
Figura 15. Efeito do pH sobre atividade fosfolipásica	32
Figura 16. Efeito da temperatura sobre atividade fosfolipásica	33
Figura 17. Constante de Michaelis-Menten	34
Figura 18. Atividade antimicrobiana da fosfolipase	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 . Resumo da purificação da fosfolipase PA2.3 de <i>P. azureus</i>	27
--	----

LISTA DE ABREVIATÖES

RP-HPCL – Reverse phase/ High Pressure Liquid Chromatography

(Cromatografia líquida de alta pressão/ Fase reversa)

PAMs – Peptídeos antimicrobianos

PLA₂ – Phosfolipase A₂ (Fosfolipase do tipo A₂)

FAP-AH – Fosfolipase com serina no sítio catalítico

PAF – Platelet Activating Fator (Fatores ativadores de plaquetas)

AA – Ácido araquigônico

5-LO – 5 lipoxigenase

COX1 e COX2 – Ciclo-oxigenase 1 e 2

PG – Prostaglandina

LT – Leucotrienos

TX – Tromboxanos

LysoPA – Ácido lisofosfático

LysoPAF – Ácido aquil-lisofosfatidilcolina

CD – Circular Dichroism (Dicroísmo circular)

MS - Mass Spectrometry (Espectrometria de massa)

MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (Ionização e dessorção a laser assistida por matriz)

RESUMO

A secreção cutânea de anfíbios é extremamente rica em moléculas bioativas, as quais protegem o animal desde diversos microrganismos à predadores. Em se tratando de riqueza, a família *Phyllomedusa* ganhou grande destaque, pois o tecido cutâneo das espécies que o compõem apresentaram grande diversidade de biomoléculas. Além dos peptídeos, uma enorme gama de substâncias químicas também são encontradas na secreção cutânea de anfíbios, tais como aminas, terpenos, esteroides, alcaloides e enzimas. Recentemente PLA₂s estão sendo descritas em secreções de anfíbios, embora quase não haja sequência primária de aminoácidos destes animais publicada. As fosfolipases são enzimas esterolíticas as quais hidrolisam glicerofosfolipídeos, sendo as do tipo A₂ (PLA₂s) comumente presentes em peçonhas de serpentes. Estas enzimas regulam uma variedade de funções fisiológicas e fisiopatológicas e, quando alteradas no organismo, contribuem para diversas doenças humanas, sendo, portanto, alvos terapêuticos para a prevenção e tratamento de doenças. Assim, o objetivo desse estudo foi a caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase do tipo A₂ presente na secreção cutânea do anfíbio brasileiro *Pithecopus azureus*. A secreção cutânea foi obtida por eletroestimulação, liofilizada e fracionada por meio de cromatografia líquida (RP-HPLC) obtendo-se aproximadamente 45 frações, as quais foram submetidas a um ensaio prévio de atividade enzimática para identificação da fração de interesse. A fração de interesse teve a massa de seus compostos analisados em MALDI-TOF/TOF. Purificada, a fosfolipase foi submetida ao ensaio de caracterização enzimática. A caracterização química parcial da fosfolipase foi obtida por espectrometria de massas, incluindo análises em MALDI TOF/TOF e LC MS/MS e pelo sequenciamento de novo obtido pelo PEAKS 7. Assim, a massa molecular média da enzima (de 15383 Da) foi obtida, bem como o sequenciamento *de novo*, com possíveis glicosilações. Análises da estrutura secundária e da estabilidade térmica foram feitas por dicróismo circular, resultando em maior percentual em α -Hélice seguida de folha- β . A caracterização enzimática com determinação de K_m e V_{max} foi realizada, sendo comparada com outras fosfolipases que utilizaram o mesmo substrato. Por fim, para avaliar atividade biológica, a fosfolipase foi testada contra bactérias Gram-

positivas e Gam-negativas, apresentando atividade. As análises estatísticas dos dados foram feitas por ANOVA.

ABSTRACT

The skin secretions of amphibians are extremely rich in bioactive molecules, which protect the animal from different organisms and predators. When it comes to wealth, family *Phyllomedusa* has received a great attention because the skin tissue of the species that compose it showed great diversity of biomolecules. In addition of peptides, a wide range of chemicals are also found in skin secretion of amphibians, such as amines, terpenes, steroids, alkaloids and enzymes. Recently PLA₂ are described in amphibians secretions, although there is almost no primary amino acid sequence published for these animals. Phospholipases are enzymes which hydrolyze estereolytic the glycerophospholipids, being the type A₂ (PLA₂) commonly present in venoms of snakes. These enzymes regulate a variety of physiological and pathophysiological functions whereby, when altered in the organism, contributes to many human diseases and being therefore therapeutic targets for the prevention and treatment of diseases. The objective of this study was the functional and structural characterization of a phospholipase A₂ present in the skin secretion of the Brazilian frog *Pithecopus azureus*. The skin secretion was obtained by electrical stimulation, freeze-dried and fractionated by liquid chromatography (RP-HPLC) generating about 45 fractions which were previously submitted to enzymatic activity assay for identification of interest fraction. This mass was analyzed for MALDI-TOF/TOF. Purified, the phospholipase was submitted to enzymatic characterization test. The partial chemical characterization of phospholipase was obtained by mass spectrometry, including MALDI-TOF/TOF and LC-MS/MS analyzes. *De novo* sequencing was obtained with bioinformatics software PEAKS 7. Thus, the average molecular weight enzyme (from 15383 Da) was gotten, with possible glycosilation. Analysis of the secondary structure and thermal stability were made by circular dichroism, revealing a higher percentage of α -helices followed by β -leaves. The enzymatic characterization with K_m e V_{max} determination was made and compared to others phospholipases that used the same substrate. Lastly, the phospholipase had activity against Gram-positive and Gram-negative bacterial. All statistical analyzes of the data were made by ANOVA.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anfíbios

A palavra “amphibia”, do grego *amphi* (dupla) e *bios* (vida), resume uma característica básica compartilhada pela maioria dos animais incluídos nesta classe: os animais vivem uma parte de suas vidas na água e outra, na terra.

A classe Amphibia compreende cerca de 7532 espécies (amphibiaweb.org), das quais a maior parte pertence a ordem Anura. No Brasil são reconhecidas 1026 espécies (<http://www.sbherpetologia.org.br>), colocando o Brasil em destaque como o país com a maior diversidade de anfíbios do mundo.

O número de compostos bioativos isolados da secreção cutânea de anfíbios vem crescendo rapidamente (Gebhard, 2004). A secreção cutânea possui uma variedade de funções biológicas, entre elas, criar e manter um ambiente favorável às trocas gasosas, defesa contra predadores e prevenção contra colonização e infecção por micro-organismos (Clarke 1997).

Há mais de 5 mil anos, a medicina oriental faz uso de secreção de pele de sapos Bufonídeos na elaboração do chá chamado Ch'an-Su usado como estimulante (Gomes *et al.*, 2007; Lytle *et al.*, 1996). Talvez este tenha sido o primeiro uso de um produto de origem animal como fármaco. Na América do Sul, povos nativos fazem uso de secreção de pele de anuros Dendrobatidae no preparo de flechas e dardos usados na caça e na guerra (Myers *et al.*, 1979). Na Amazônia brasileira, índios Katukina utilizam secreção de pele de *Phyllomedusa bicolor* em rituais conhecidos como kampo ou kambo (Den Brave *et al.*, 2014).

Somente no início da década de 1950, os princípios bioativos de pele de anfíbios ganham destaque a partir dos primeiros trabalhos do pesquisador italiano Vittorio Erspamer. Em 1959, ele isolou e caracterizou a leptodactilina, uma amina biogênica com atividade nicotínica, a partir de extratos de pele da rã sul-americana *Leptodactylus ocellatus*. Seu grupo de pesquisa foi responsável pelo isolamento e caracterização de diversos

peptídeos de anfíbios, especialmente a partir de pele de anfíbios Phyllomedusineos do Brasil e da Argentina.

1.2 Família Phyllomedusidae

Phyllomedusidae é uma família que inicialmente foi criada por Gunter em 1858, sofreu algumas modificações taxonômicas ao longo dos anos, tornando-se subfamília Phyllomedusinae, pertencente à família Hylidae. Porém, recentemente, foi recriada por Duellman e colaboradores (2016). *Phyllomedusidae* é uma família que abrange 8 gêneros, dentre eles, *Phythescopus*.

A espécie *Phythescopus azureus* também sofreu diversas alterações taxonômicas, sendo originalmente denominada *Phyllomedusa azurea*, por Cope (1862), sendo em 1866 alterada para *Phythescopus azureus* por este mesmo pesquisador. Em 1926 tornou-se *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* (Mertens, 1926), posteriormente *Pithecopus hypochondrialis azureus* (Lutz, 1966), *Phyllomedusa azurea* (Norman, 1994) e agora renomeada *Phythescopus azureus* por Duellman e colaboradores (2016).

Este anfíbio está distribuído no leste da Bolívia, Paraguai até o norte da Argentina, e em áreas das regiões do Pantanal e Cerrado Brasileiro, ocorrendo nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo (Frost, 2008).

Pithecopus azureus é descrita como espécie arborícola, observando-se adaptações morfológicas que beneficiam tal hábito, como o primeiro dedo da pata dianteira e o primeiro e segundo das patas traseiras oponíveis aos demais e, mesmo tendo a capacidade para saltar, os representantes deste gênero são normalmente vistos caminhando lentamente sobre galhos e folhas em busca de alimento ou locais para descanso (Duellman & Trueb 1994; Caramaschi & Cruz 2002; Caramaschi 2006).

De acordo com Caramaschi (2006), a faixa branca estreita no lábio superior, não atingindo a pálpebra inferior; a presença de uma região inguinal e lados de membros com barras transversais pretas sobre fundo laranja ou vermelho e ampla faixa verde ao longo da superfície dorsal das coxas são características principais dessa espécie (**figura 1**).

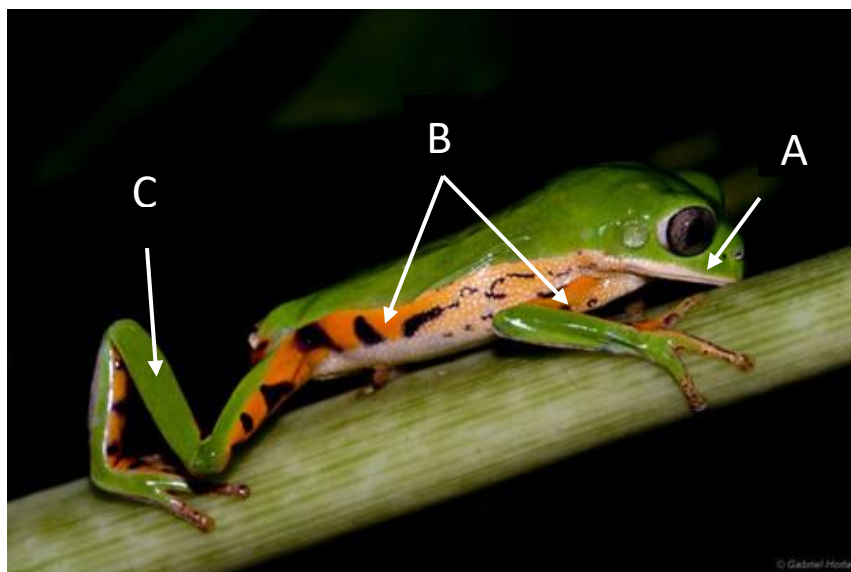


Figura 1. Espécime adulto de *Pithecopus azureus*. As setas indicam as características principais deste animal. (A) Faixa branca estreita no lábio superior, (B) região com barras transversais pretas em fundo laranja, (C) faixa verde na região dorsal da coxa. Foto: Gabriel Horta (<http://www.flickr.com/photos/gabrielhorta/4606985486/sizes/l/in/photostream/>).

Os Phyllomedusaneos estão entre os anfíbios mais estudados devido à riqueza de moléculas de interesse presentes em sua secreção cutânea, principalmente peptídeos antimicrobianos. Em 1985, Erspamer e colaboradores já haviam listado 23 peptídeos isolados e identificados, sendo estes pertencentes a pelo menos 7 famílias de peptídeos diferentes. Em 2011, Calderon e colaboradores publicaram em uma revisão mostrando que, somente na secreção cutânea de *Pithecopus azureus*, já havia sido encontrados 41 peptídeos, apresentando um largo espectro de atividades antimicrobiana, neuroativa e sobre o músculo liso.

Conceição e colaboradores (2007) ao analisar outras atividades da secreção de *Pithecopus azureus* sugeriram a presença de fosfolipases e proteases.

1.3 Fosfolipases

As fosfolipases são enzimas esterolíticas as quais hidrolisam glicerofosfolipídeos, podendo ser encontradas em plantas, bactérias, fungos, veneno de abelhas, em diversos tipos de células, tecidos e órgãos de mamíferos e em peçonha de serpentes (Wittcoff, 1951; Van-Der-Boch,

1989; Osipov & Utkin, 2011). Segundo Yang e colaboradores (2014), estas enzimas convertem os fosfolipídios em mediadores lipídicos ou segundos mensageiros que regulam uma variedade de funções fisiológicas e fisiopatológicas. Desta forma, a desregulação de fosfolipases contribui para diversas doenças humanas e, portanto, foram identificadas como alvos terapêuticos para a prevenção e tratamento de doenças.

Todos os quatro grupos éster de um fosfolípido são suscetíveis a hidrólise enzimática (**figura 2**). Uma fosfolipase que cliva o éster de acil na posição sn - 1 é designada uma fosfolipase A₁, e um que cliva na posição sn - 2 é designada de fosfolipase A₂. Uma enzima que cliva a ligação de fosfodiéster no lado de glicerol é designada uma fosfolipase C, e no lado polar, uma fosfolipase D (Dennis, 1983). Além da posição de clivagem, estas enzimas são classificadas também de acordo com sua função, regulação, sequência de aminoácidos, localização, estrutura e papel dos íons divalentes (Dennis, 1994).

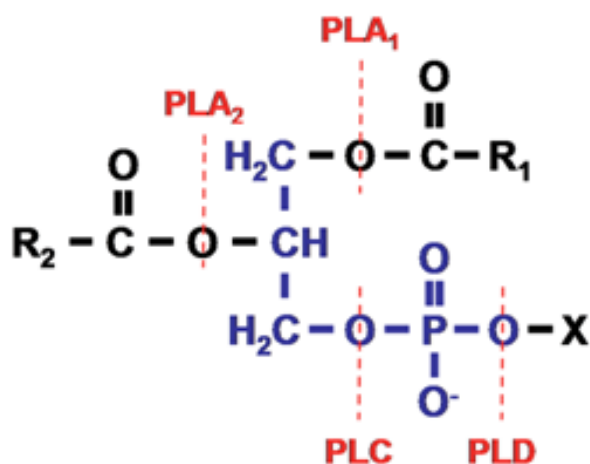


Figura 2. Sítio de ação das fosfolipases sobre os glicerofosfolípeos. A molécula de fosfolípido consiste em glicerol-3-fosfato (azul). X representa o álcool polar como colina, serina, etanolamina, mio-inositol, glicerol e fosfatidiglicerol; R1 e R2 representam cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos, que são apolares. PLA, PLC e PLD, representam as fosfolipases(vermelho) (Yao, 2011).

As primeiras fosfolipases A₂ (PLA_{2s}) a serem purificadas e caracterizadas foram extraídas da peçonha de cobra, sendo constatado em sua estrutura a presença de 6 pontes dissulfeto. As 6 pontes dissulfeto também foram identificadas em outras fosfolipases, como em PLA_{2s} do pâncreas de mamíferos (Dennis, 2011).

Atualmente, existem diversas classificações das fosfolipases A₂, que variam de acordo com sua massa molecular, sua localização no organismo, sua estrutura primária e secundária, atividade catalítica e sua função. A classificação estabelecida por Schaloske & Dennis (2006) é bastante aceita, sendo resumidamente observada na **Figura 3**.

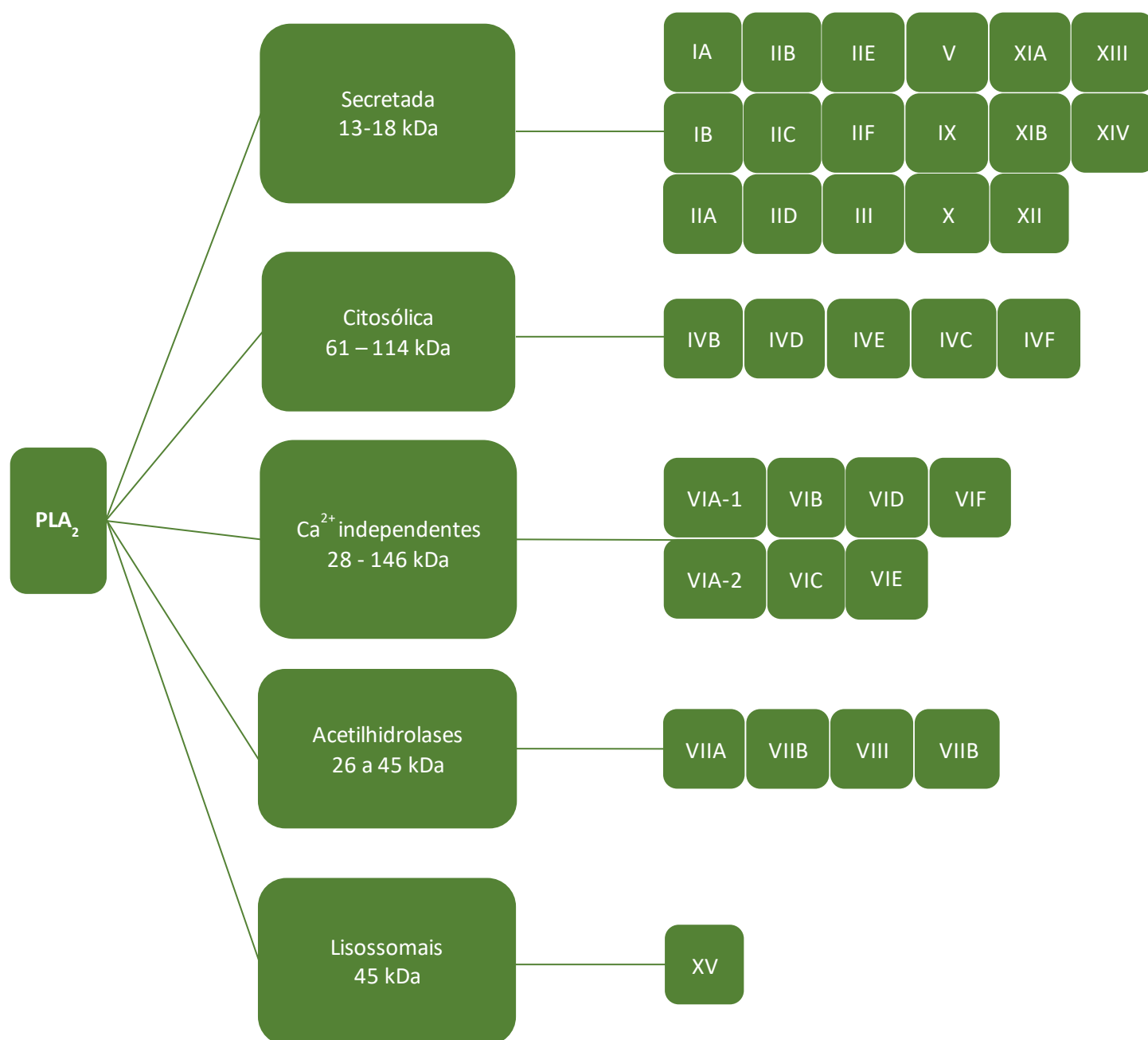


Figura 3. Classificação das PLA₂s. Dados compilados a partir de Schaloske & Dennis (2006).

De acordo com esta classificação, as fosfolipases do tipo A₂ estão organizadas em cinco grupos distintos. As fosfolipases secretada apresentam massa molecular variando entre 13 a 18 kDa, contendo, de um modo geral, 5 a 8 ligações dissulfeto. Além disso, são enzimas que apresentam dependência do Ca²⁺ para a catálise. Este grupo é subdividido em 17 subgrupos denominados IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, XIV.

As fosfolipases citosólica apresentam massa molecular variando entre 61000 e 114000 Da, sendo reorganizadas em subgrupos denominados IVA, IVB, IVC, IVD, IVE, IVF.

As fosfolipases independente de Ca²⁺, apresentam massa molecular variando entre 28 a 146 kDa e seus subgrupos são descritos como VIA-1, VIA-2, VIB, VIC, VID, VIE, VIF acetil-hidrolases de fator ativador de plaquetas (PAF-AH) e, lisossomais.

As fosfolipases acetilhidrolases apresentam massa molecular entre 26 e 45 kDa, sendo subdividida em grupos denominados VIIA, VIIB, VIII, VIIB.

Por último, as PLA₂ lipossômicas, que apresentam apenas um grupo denominado XV, apresentam massa molecular de 45 kDa.

Desta forma, observa-se que há diversos grupos de fosfolipases, em que suas variadas funções já estão bem estabelecidas na literatura. Sabe-se que, além do seu fundamental papel no metabolismo de lipídeos, as PLA₂s estão intensamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico (AA), que quando livre, pode ser metabolizado pela 5 - lipoxigenase (5 - LO) ou ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX1 e COX2) para gerar numerosos mediadores lipídicos, tais como prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) e tromboxanos (TX). Estas moléculas são bioativas e podem participar de uma multiplicidade de funções biológicas, como resposta imune, regulação do sono, percepção da dor (Kini, 2005; Schaloske e Dennis, 2006; de Maria *et al.*, 2007), além de fatores associados a inflamação, como vasoconstrição e vasodilatação, quimiotaxia, broncoespasmos, aumento da permeabilidade vascular e potenciação de edema, como ilustrados simplificadaamente na **figura 4** (Gijón & Leslie, 1999).

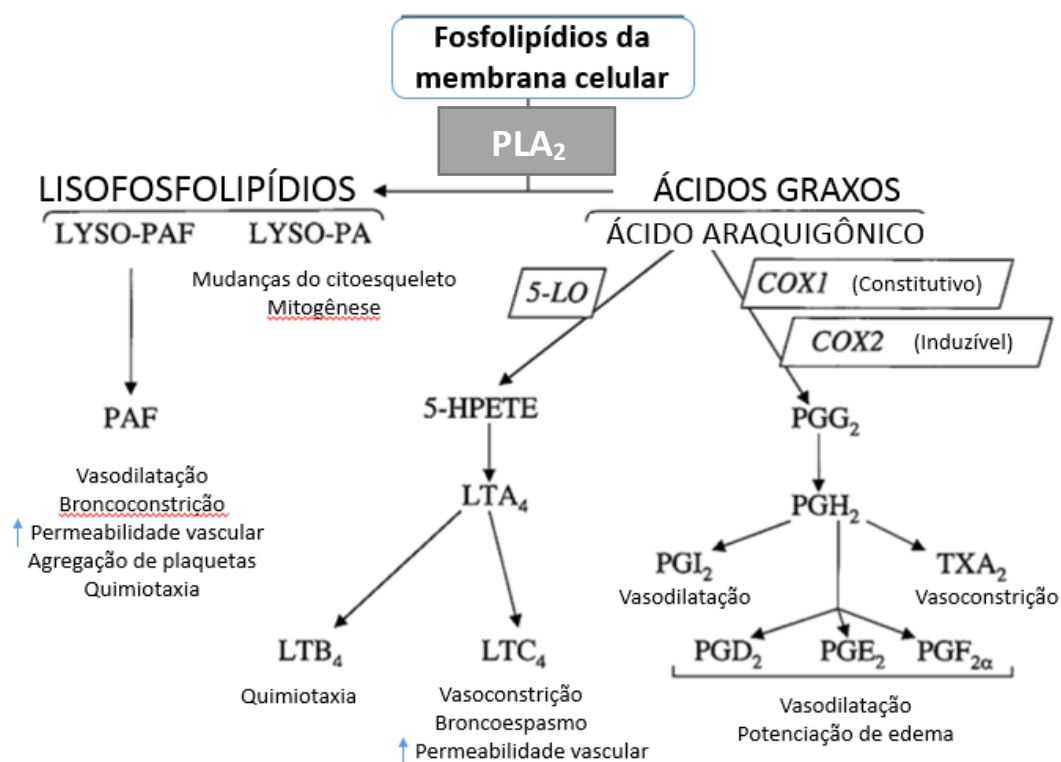


Figura 4. Produção de mediadores lipídicos pela PLA₂, adaptado de Gijón & Leslie (1999).

Alguns lisofosfolípidos, tais como o ácido lisofosfatídico (lysoPA), também podem mediar a ativação celular e o ácido alquil-lisofosfatidilcolina (lysoPAF), que pode ser acetilado para produzir fator de ativação de plaquetas (PAF), um potente mediador envolvido em numerosas respostas fisiológicas e patológicas (Gijon & Leslie 1999).

Do ponto de vista estrutural, Arni & Ward (1996) descrevem as fosfolipases A₂ de peçonhas como proteínas que contém de 119 a 134 aminoácidos, apresentam quatro alfa-hélices, que estão ligadas entre si por 5 a 8 pontes dissulfetos, duas fitas beta-anti-paralelas e em sua estrutura terciária, estão presentes duas fitas alfa-anti-paralelas que constituem um canal hidrofóbico, direcionando o substrato para o sítio catalítico. Apresentam um sítio catalítico muito bem conservado, sendo este composto por 4 aminoácidos (His48, Asp 49, Tyr 52 e Asp, 99) e a alça de ligação ao cálcio também muito bem conservada, sendo esta também composta por 4 aminoácidos (Tyr 28, Gly 30, Gly 32 e Asp 99).

Nas fosfolipases cataliticamente ativas, o resíduo de ácido aspártico na posição 49 possui um importante papel na coordenação do íon cálcio divalente,

que auxilia na estabilização do intermediário tetraédrico. Juntamente com outros aminoácidos, este resíduo é responsável pela fixação do substrato ao sítio enzimático e assim, conseqüentemente, pela atividade catalítica exercida por estas enzimas. Entretanto, a substituição natural de Asp49 por uma lisina em PLA₂s homólogas, impede a coordenação do íon Ca⁺² e, ainda, o nitrogênio da cadeia lateral da Lys49 ocupa a posição do íon Ca⁺², inviabilizando a ocorrência da reação catalítica (Arni & Ward, 1996; Scott *et al.*, 1990). Entretanto, mesmo não desempenhando a função de enzima catalítica, as enzimas homólogas também apresentam atividade miotóxica.

Contudo, a atividade biológica e funcional de determinadas PLA₂ podem ser moduladas por vários compostos além do íon Ca⁺², como os ácidos graxos (Lee *et al.*, 2001), outros íons, como o manganês (Soares *et al.*, 2002; Toyama *et al.*, 2005), carboidratos e outros. Esses compostos podem influenciar a estrutura e função da enzima, aumentando, diminuindo ou extinguindo determinados efeitos biológicos das PLA₂ secretórias.

Na presença de Cálcio, alguns tipos de fosfolipases A₂ mostraram-se capazes de causar danos a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas devido a sua atividade catalítica, atuando diretamente sobre os fosfolipídeos de membrana. Algumas destas enzimas estão associadas ao sistema imunológico, uma vez que são ativadas por células do sistema imune mediante a presença de um patógeno (Hurley, 2014).

Um aspecto interessante foi levantado por Buckland & Wilton (2000) sobre a ação antimicrobiana de fosfolipase A₂ do tipo II secretada por mamíferos. Em um dos trabalhos descritos, tratou-se *Staphylococcus aureus* com doses baixas de PLA₂ extraída de coelho. Curiosamente, observou-se mínima atividade desta enzima contra a bactéria, apesar de ter observado hidrólise quase completa da membrana da bactéria. Experimentos adicionais mostraram que *S. aureus* é capaz de continuar sintetizando fosfolipídios mesmo sob atividade da enzima. Aparentemente, algo parecido ocorreu com a bactéria *Micrococcus luteus*, apesar de ter sido evidenciado 60% de morte celular associada a hidrólise da membrana. Assim, a capacidade da PLA₂ de matar estas bactérias parece envolver o equilíbrio entre a hidrólise de fosfolípido pela enzima e a síntese de lipídios pelas bactérias.

Além disso, outro fator importante que afeta o potencial desta enzima

contra bactérias é a presença da parede celular desses microrganismos. Desta forma, a suscetibilidade de bactérias Gram-positivas à PLA₂ varia muito entre espécies, por influência de outros fatores, tais como fatores de crescimento e do estado de degradação da parede celular. Entretanto, quando lisostafina (uma protease específica da parede celular) foi utilizada em conjunto com a PLA₂ contra Gram-positivas, a potencialidade da fosfolipase foi aumentada (Buckland & Wilton, 2000).

Bacha (2014) indicou que a atividade bactericida das PLA₂ do tipo IIA é altamente catiônica e mostrou-se capaz de penetrar a parede celular de bactérias Gram-positivas. Em contrapartida, a eficácia de PLA₂s contra bactérias Gram-negativas depende da presença de resíduos básicos na região que engloba a alfa-hélice N – terminal. Além disso, comprovou-se que a presença de Ca²⁺ é crucial para a atividade antibacteriana de PLA₂ do tipo IIA.

A PLA₂ que apresentou maior atividade antibacteriana foi a isolada da peçonha da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus* – crotoxina B - sendo mais potente contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter aerogenes*. Ela exibe maior hidrofobicidade na região C-terminal (102-120) quando comparada a outras PLA₂. A região C -terminal de algumas fosfolipases tem sido sugerido como o segmento responsável pela sua atividade citotóxica e miotóxica. Possivelmente a hidrofobicidade da enzima pode desempenhar um importante papel para a ação antimicrobiana (Samy *et al*, 2006).

Assim, fosfolipases são amplamente encontradas em diversos seres vivos, apresentando diversas funções que vão além da síntese e remodelagem dos lipídeos de membrana celular, uma vez que exercem funções fisiológicas indiretas a partir da hidrólise dos fosfolipídeos. Entretanto, a presença desta enzima na secreção cutânea de anfíbios ainda não foi explorada, apesar de já se conhecer amplamente na literatura o potencial bioativo destas secreções.

2. JUSTIFICATIVA

A secreção cutânea dos anfíbios contém uma infinidade de substâncias biologicamente ativas empregadas em três funções principais: (1) proteção contra o desenvolvimento de microrganismos patogênicos; (2) defesa passiva contra o ataque de predadores e (3) feromônios. Estima-se que menos de 20% das espécies de anfíbios foram estudadas no que diz respeito ao potencial biotecnológico da secreção cutânea. Mesmo nessas, o conhecimento a respeito da composição química e das propriedades farmacológicas das secreções cutâneas é apenas parcial, o que indica que merecem devida atenção afim de novas descobertas, pois trata-se de uma rica fonte de moléculas bioativas. (Schwartz, *et al.*, 2005).

A presença de fosfolipases A₂ como um princípio ativo na peçonha de animais como serpentes, aranhas, escorpiões, abelhas, vespas, moluscos e peixes é conhecida, porém sua presença em secreção cutânea de animais como peixes, anelídeos e moluscos é inexplorada (Wittcoff, 1951; Van-Der-Boch, 1989; Osipov & Utkin, 2011).

Em anfíbios podemos destacar apenas três trabalhos sobre a presença de fosfolipases na secreção cutâneas. Baek e colaboradores (2000) na busca por peptídeos que interagissem com receptores de adenosina A₁ e A₂, acabaram por descrevendo parcialmente duas PLA₂ em *Rana rugosa*, porém neste trabalho não foi realizado nenhum estudo mais aprofundado em termos enzimáticos; Lai *et al.*, (2002) e Guo *et al.*, (2012) descreveram a presença de atividade fosfolipásica nas secreções das salamandras *Tylotriton verrucosus* e *Andrias davidianus*, respectivamente, porém, não fizeram estudos em termos de caracterização química ou enzimática dessa enzima nesses animais.

3. OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar, quanto à sua função e estrutura, uma fosfolipase do tipo A isolada da secreção cutânea do anuro *Pithecopus azureus*.

3.1 Objetivos específicos

- Fracionar a secreção cutânea de *Pithecopus azureus* utilizando cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC).
- Identificar a fração que apresentar atividade de degradação de fosfolipídios.
- Determinar a massa molecular da PLA₂ purificada.
- Determinar o pH e temperatura em que ocorre maior atividade da PLA₂.
- Determinar a constante de Michaelis-Menten (K_m).
- Obter o sequenciamento parcial da enzima por espectrometria de massa.
- Analisar a similaridade das estruturas primárias das moléculas identificadas com outras fosfolipases.
- Obtenção da estrutura secundária por meio do dicroísmo circular.
- Analisar a atividade biológica da enzima em ensaio de atividade antibacteriana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da secreção cutânea

Adultos de *P. azureus* foram coletados no município de Monte Alegre de Goiás (GO) (Licença SIS/BIO 51541-1). A secreção foi extraída no local de coleta por meio de eletroestimulação, 50 milivolts por 6 segundos (Grant 2002). A pele foi lavada com água Milli-Q e a secreção armazenada a -20 °C. Os animais utilizados foram mantidos sob observação por 30 minutos e devolvidos ao seu local de origem. A técnica empregada para a extração da secreção não resulta na morte dos indivíduos e não apresenta danos físicos ou mudanças comportamentais nos animais utilizados. No laboratório de Toxinologia -UnB a secreção foi liofilizada (Thermo Savant SPD121P – Thermo scientific) e alíquotas de 20mg foram separadas em eppendorfs e guardadas a -20 °C até o uso.

4.2 Purificação da enzima

4.2.1 Perfil cromatográfico

Alíquotas (10 mg/ml) da secreção bruta de *Pithecopus azureus* liofilizada foram solubilizadas com 1 ml de 0,1% (v/v) de TFA/água, homogeneizadas e centrifugadas por 10 min a 12000 rpm. Do sobrenadante obtido, 200 µl foi injetado em uma coluna analítica C₁₈ de fase reversa (Vydac 218TP54, 250 mm x 4,5 mm, 5µm), a um fluxo de 1 ml/min.

Primeiramente, a coluna foi equilibrada com 0,1% (v/v) de TFA/água (solvente A) por 20 minutos e, em seguida, foi aplicado um gradiente linear de 0–50% de acetonitrila/TFA 0,1% (solução B) por 50 minutos e 50–100% de B por 5 minutos. A absorbância foi monitorada a 216 nm e as frações foram manualmente coletadas, secadas sob vácuo em speed vac e armazenadas a -20°C.

4.2.2 Perfil Recromatográfico

Alíquotas referentes a 10 corridas cromatográficas acumuladas e liofilizadas da fração de interesse foram solubilizadas com 500 µl de 0,1% (v/v) de TFA/água e homogeneizadas. A Recromatografia ocorreu por meio de RP-

HPLC em coluna analítica C₈ de fase reversa (Shim-pack CLC-C8 (M) 150x4,5 mm.D) e acumulada para análises posteriores.

Inicialmente, a coluna foi equilibrada com 0,1% (v/v) de TFA/água (solvente A) por 20 minutos. Posteriormente, 50 µl da amostra foi injetada no HPLC. A concentração do solvente B saiu do 0 e chegou a 33% nos 5 primeiros minutos. Posteriormente, a concentração de B foi aumentando lentamente durante 30 minutos, próximo a um platô, até chegar a concentração de 36%. Por fim, nos últimos 5 min a concentração do solvente B chegou à 48%. A eluição ocorreu sob fluxo de 1 mL/min e a detecção UV a 216 nm. A proteína purificada foi coletada e, posteriormente, secada sob vácuo.

Apenas para a realização do ensaio biológico, a fração eluída da recromatografia foi submetida a um sistema de ultrafiltração AMICON, utilizando membrana de retenção para PM menor que 10 kDa.

4.2.3 Monitoramento das frações com atividade fosfolipásica

Todas as análises de atividade fosfolipásica da secreção bruta da pele de *P. azureus*, bem como de seus respectivos compostos fracionados por cromatografia, foram feitas em triplicata e em três ensaios independentes, baseadas no método descrito por Marinetti, 1965.

Para os ensaios iniciais, em que se analisou a secreção bruta, as frações reunidas em grupos (G1, G2 e G3) e a determinação da fração cromatografadas contendo fosfolipase, utilizou-se, como substrato, emulsão de gema de ovo na concentração de 2 mg/ml diluído em tampão Tris-HCL 100 mM a pH 8,5. Em cada poço, foi adicionado 150 µl da emulsão de ovo, 10 µl de cloreto de cálcio e 10 µl de tampão Tris-HCl diluído à amostra na porção referente a uma corrida cromatográfica. Para o controle negativo foi utilizado 150 µl de emulsão, 10 µl de cloreto de cálcio e 10 µl de tris-HCl, e para o controle positivo, 150 µl de emulsão, 10 µl de cloreto de cálcio e 10 µl peçonha bruta da jararaca *Bothrops moojeni* em tampão Tris-HCL, na concentração de 10 mg/ml. A atividade fosfolipásica foi monitorada por espectrofotômetro.

4.3 Caracterização enzimática

4.3.1 Atividade enzimática da fosfolipase

Para os ensaios de caracterização enzimática, em que se determinou pH e temperaturas ótimas, dependência de Ca^{2+} , cinética enzimática, concentração efetiva de proteína e tempo ótimo de atividade, utilizou-se como substrato a fosfatidilcolina 3 mM (Sigma P5394 fosfatidilcolina ("N60%"), Sigma, St. Louis, MO) em tampão Tris-HCL 100 mM a pH 8,0. Para facilitar a sua solubilização, utilizou-se 1,0 ml de clorofórmio para dissolver a fosfatidilcolina, que, posteriormente, foi seca utilizando um jato de ar comprimido. A fosfatidilcolina já seca foi dissolvida em tampão, formando uma emulsão.

A secreção bruta de *P. azureus* e as frações cromatografadas foram ressuspendidas em 10 µl de Tris-HCl junto a 10 µl de cloreto de cálcio e, posteriormente, encubadas à temperatura de ensaio por 20 minutos.

Para o preparo do ensaio, pipetou-se 150 µl da emulsão em cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, 20 µl das amostras incubadas foram adicionadas aos poços. Após 60 minutos, a leitura da placa foi realizada em 405 nm (Multiskan MCC/349, ThermoFisher Scientific. Para o controle negativo foi utilizado 150 µl de emulsão, 10 µl de cloreto de cálcio e 10 µl de tris-HCl, e para o controle positivo, 150 µl de emulsão, 10 µl de cloreto de cálcio e 10 µl peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em tampão Tris-HCL, na concentração de 10 mg/ml.

Para a tabela de purificação, calculou-se a unidade atividade da enzima (U) seguindo os seguintes passos:

- 1) Absorbância Inicial (ABS_i) – Absorbância Final (ABS_f) = Absorbância Resultante (ABS_R).
- 2) Determinação da Unidade de Atividade Enzimática (U), que é definida como a quantidade de enzima capaz de diminuir 0,01 unidades de absorbância por minuto.

$$U = (\text{ABS}_R/0,01)/60$$

Onde 60 corresponde ao tempo total (em minutos) em que se obteve atividade enzimática.

Calculo da Atividade Total

$$U/\text{ml} = (U \times 1000)/20$$

Onde 20 correspondem ao volume (μ l) de enzima utilizada no ensaio e 1000 corresponde a conversão para ml.

Cálculo da Atividade Específica

U/mg

Onde mg corresponde a quantificação da enzima determinada por Bradford.

Cálculo do Fator de Purificação

Atividade Específica Final (AEF)/ Atividade Específica Inicial (AEI)

Onde (AEF) corresponde a atividade específica obtida na etapa de purificação analisada e a (AEI), a atividade específica obtida com o bruto.

Cálculo do rendimento (%)

(Atividade Total Final (ATF)/Atividade Total Inicial (ATI)) x 100

Onde ATF corresponde a atividade total obtida na etapa de purificação analisada, a (AEI), a atividade total obtida com o bruto e 100 corresponde a conversão para %.

4.3.2 Análise do pH

O ensaio para verificação do pH para atividade da PLA₂ foi realizado utilizando o mesmo método do item 4.5.1. Para tal, variou-se o pH em uma faixa entre 6.5 e 10 utilizando diferentes tampões. Tris-HCL (100 mM) para pH na faixa de 6,5 a 9,5 e bicarbonato-carbonato (100 mM) para o pH 10.

4.3.3 Análise da temperatura

O ensaio foi realizado nas mesmas condições descritas no método 4.5.1, entretanto em pH 8,5. A variação da temperatura foi ampla, sendo a atividade fosfolipásica analisada na faixa de 1° a 100° C.

4.3.4 Cinética enzimática

O ensaio de cinética enzimática foi realizado avaliando a velocidade da atividade fosfolipásica em diferentes concentrações de substrato. O ensaio foi

realizado nas mesmas condições descritas no método 4.3.1, entretanto, a concentração de fosfatidilcolina variou em uma faixa de 0 a 10 mM e o pH e temperatura ótimos utilizados foram os já pré-estabelecidos previamente.

Cálculo de K_m e $V_{máx}$

Para o cálculo de K_m e $V_{máx}$, utilizou-se a equação de Michaelis-Menten, a qual expressa a relação hiperbólica entre velocidade inicial e a concentração de substrato:

$$\frac{V_o}{K_m + [S]} = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]}$$

Em que $V_{máx}$ é o valor máximo da velocidade inicial quando todos os sítios ativos estão ocupados, K_m é a constante de Michaelis e $[S]$ é a concentração do substrato. (Wilson et al, 2010).

4.4 Caracterização da estrutura primária por espectrometria de massa

4.4.1 Digestão da proteína

Uma alíquota de 20 µg de proteína foi digerida segundo o método de Haider *et.al.*, (2012). À solução de proteína foi adicionado 15 µl de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mM e 1,5 µl de 1, 4-Dithio- DL-threitol (DTT) 100 mM, sendo incubado a 90°C durante 7 minutos. Após arrefecimento até a temperatura ambiente, adicionou-se 3 µl de iodoacetamida (IAA) 100 mM a esta solução e incubou-se durante 25 minutos no escuro.

Após esse período, acrescentou-se 1 µl de 0,1 µg/µl de tripsina modificada para espectrometria de massas e incubou-se a 37 °C durante 4 horas. Finalmente, adicionou-se mais 1 µl de tripsina e incubou-se durante a noite a 30°C.

No dia seguinte a solução foi dessalinizada usando micro colunas de C18 com água/TFA 0,12% e eluídas com acetonitrila/TFA 0,12%.

4.4.2 MALDI-TOF/TOF (Ab Sciex 5800)

Para detecção da massa da proteína íntegra e o seu grau de pureza, utilizou-se da ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). A

amostra foi solubilizada em água Milli-Q e acetonitrila (1:1). A matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) a 20 $\mu\text{g/mL}$, solubilizadas no mesmo solvente, foi empregada como fonte de ionização dentro da faixa de m/z de 500 a 5.000 Da em modo refletor positivo. Já a matriz ácido sinapínico (SA) a 20 $\mu\text{g/mL}$, solubilizadas no mesmo solvente, foi empregada como fonte de ionização dentro da faixa de m/z de 5.000 e 50.000 em modo linear-positivo.

Em cada halo de uma placa de aço inoxidável própria para análise por MALDI, uma alíquota de 0,5 μL de amostra foi misturada com o mesmo volume de matriz. Após secar completamente, as amostras foram colocadas no espectrômetro de massas para dessorção com laser e ionização pela aquisição de prótons ou elétrons provenientes da matriz. A calibração do equipamento foi realizada por meio de um padrão externo. Os espectrogramas (MS) gerados no formato “.T2D” foram convertidos para o formato “.mzxml” pelo software T2Dconverter (<http://sequest.scripps.edu/ygao/>) para análise dos dados pelo software mMass 5.5.0 (<http://www.mmass.org/>), ambos disponíveis gratuitamente.

Para o sequenciamento *De Novo*, a mesma metodologia foi realizada, entretanto, a amostra analisada estava digerida com tripsina (ver item 4.3.1), sendo os peptídeos com mais intensidade de sinal selecionados para fragmentação em modo MS/MS refletido positivo.

Os espectrogramas (MS/MS) gerados foram analisados no software Mascot Distiller (<http://www.matrixscience.com/distiller.html>).

4.4.3 LC-MS/MS (LTQ Velos Orbitrap Thermo Scientific)

As amostras de peptídeos foram ressuspensas em ácido fórmico a 0,5% (FA) e fracionadas utilizando um sistema nano HPLC Easy-nLC II (Proxeon) numa embalagem interna 2 cm \times 150 μm ; Pré-coluna (Reprosil-Pur C18-AQ, 5 μm , 120 Å, Dr. Maisch) e 20 cm \times 75 μm i.d. (Reprosil-Pur C18-AQ, 3 μm , 120 Å, Dr. Maisch) acoplado ao espectrômetro de massa LTQ Velos Orbitrap. A cromatografia foi realizada a 300 nL / min com 95% de água, 5% de ACN e 0,1% de FA como fase móvel A, e 95%, 5% de água e 0,1% de FA como fase B.

O espectrômetro de massa Orbitrap foi controlado pelo software Tune 2.6.0 e Xcalibur 2.1, configurado para operar no modo de aquisição dependente

de dados (DDA) para alternar automaticamente entre MS completo e aquisição de MS/MS. Os 10 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação por CID-MS/MS.

4.4.4 Análise de dados

4.4.4.1 Banco de dados

As sequências de proteínas geradas pelos espectros e obtidas pelo Peaks 7.0 foram confrontadas em um banco de sequencias de aminoácidos obtido pelo banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) com busca para “phospholipase” em 7 de Setembro de 2016, totalizando 71.750 sequências.

As buscas foram realizadas utilizando como parâmetro a carboxamidometilação de cisteínas; ma pontuação de corte definida para aceitar 1% da taxa de falso-descoberta (FDR); apenas os peptídeos com mais de seis resíduos de aminoácidos foram aceitos; apenas os peptídeos com menos de 10 ppm de desvio do precursor peptídico teórico foram considerados e as proteínas identificadas foram mostradas no modo de parcimônia máxima.

4.4.4.2 Processamento e análise de dados

Para a análise dos dados, os arquivos com a extensão “.raw” gerados pelo espectrômetro, foram importados pelo software PEAKS 7.0 para a realização de sequenciamento *de novo* dos peptídios a partir dos espectrogramas e buscas em bancos de dados. Neste, alguns parâmetros de busca foram ajustados, incluindo carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável, máximo de 3 sítios de clivagem perdidos pela tripsina, tolerância de erro de massa dos íons precursores e dos íons fragmentos em 10 ppm e 0,5 Da, respectivamente. Score de sequenciamento local acima de 65% foi utilizado para considerar as identificações como positivas.

4.5 Caracterização da estrutura secundária

4.5.1 Dosagem de proteína

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina - BSA (*Sigma-Aldrich*) como padrão. Um volume de 20 µL da amostra foi adicionado a 1 mL do reagente de Quick Start Bradford reagent 1x (*Bio-Rad*) (utilizou-se 20 µL de água destilada como branco). Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a leitura da absorbância das amostras a 595 nm.

4.5.2 Análises de estruturas secundárias e estabilidade estrutural por dicroísmo circular.

Medidas de Dicroísmo Circular (CD) foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815 equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier. Os espectros foram obtidos em cubeta de 0,1 cm. As análises foram conduzidas com a enzima fosfolipase na concentração de 0,083 mg/mL. O tampão utilizado no ensaio foi Tris HCl (2mM) em pH 8,5. As elipticidades obtidas foram convertidas em elipticidade molar $[\theta]$ segundo equação 1, e os espectros corrigidos com subtração da linha de base do tampão.

Equação 1:
$$[\theta] \text{ (grau.cm}^2\text{.dmol}^{-1}\text{)} = 115.\alpha/10.C.l$$

Onde, α é o sinal dicroico em miligraus, C é a concentração da amostra (mg.mL^{-1}) e l é o trajeto óptico (cm) da cubeta utilizada. A desnaturação térmica foi acompanhada de 25 a 95 °C e a curva obtida, ajustada com base na fração de proteínas no estado nativo e desnaturado (Pace, Shirley, Thompson, 1989) e a estabilidade estrutural da enzima caracterizada. " O conteúdo de estrutura secundária foi calculado utilizando-se o programa *K2D2* (Iratxeta & Navarro, 2008).

4.6 Ensaio biológico

Atividade antimicrobiana

Para verificar a atividade da fosfolipase contra micro-organismos, foi realizado um ensaio antimicrobiano inicial em placa de 96 poços, em triplicata, contra as bactérias patogênicas Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e contra Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), cultivadas em Mueller-Hinton, *overnight*, a 37°C. Posteriormente, diluiu-se as bactérias na proporção de 1:100 (Gram-positiva) e 1:50 (Gram-negativa).

Uma alíquota de 200 µl de cada cultura foi transferida para um falcon contendo 7ml de meio fresco, sendo incubadas a 37°C sob agitação constante, até densidade ótica de 1,0 a 595nm.

O ensaio foi feito em diluição seriada e em triplicata. Desta forma, no primeiro poço da placa, foi pipetado 100 µl da fosfolipase solubilizada em água estéril na concentração de 16 µM. Do segundo poço ao sexto, foi pipetado 50 µl de água MilliQ estéril. Uma alíquota de 50 µl do primeiro poço foi diluído no segundo poço, em seguida, 50 µl do segundo poço foi diluído no terceiro, e assim por diante até o sexto e último poço, em que 50 µl foi desprezado. Quando todos os poços apresentaram volume de 50 µl, adicionou-se 50 µl do meio contendo a bactéria a ser testada, compondo um volume final de 100µl.

Em triplicata, utilizou-se como controle positivo 50µl da suspensão de bactéria com 50µl do meio, já como controle negativo, utilizou-se 50µl de formaldeído 0,4% com 50µl de suspensão de bactéria. A leitura da absorbância foi feita a 595nm após 24h de incubação a 37°C.

4.7 Análise Estatística

Os testes estatísticos apropriados para os resultados obtidos foram realizados para o ensaio do efeito da temperatura sobre atividade fosfolipasica, sendo analisados pelo programa estatístico Tukey Btukey Alpha (0.05), sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação e purificação da fosfolipase.

5.1.1 Perfil cromatográfico

A secreção cutânea de *Pithecopus azureus* apresentou um perfil cromatográfico com a coleta de 45 frações.

Para identificar as frações correspondentes às fosfolipases, as frações cromatografadas foram separadas em 3 grupos (G1, G2 e G3), de acordo com o percentual de eluição de acetonitrila, sendo a região mais hidrofóbica (em torno de 40% de acetonitrila), enumeradas de 1 a 11, denominadas posteriormente de PA1 à PA11 (**Figura 5**).

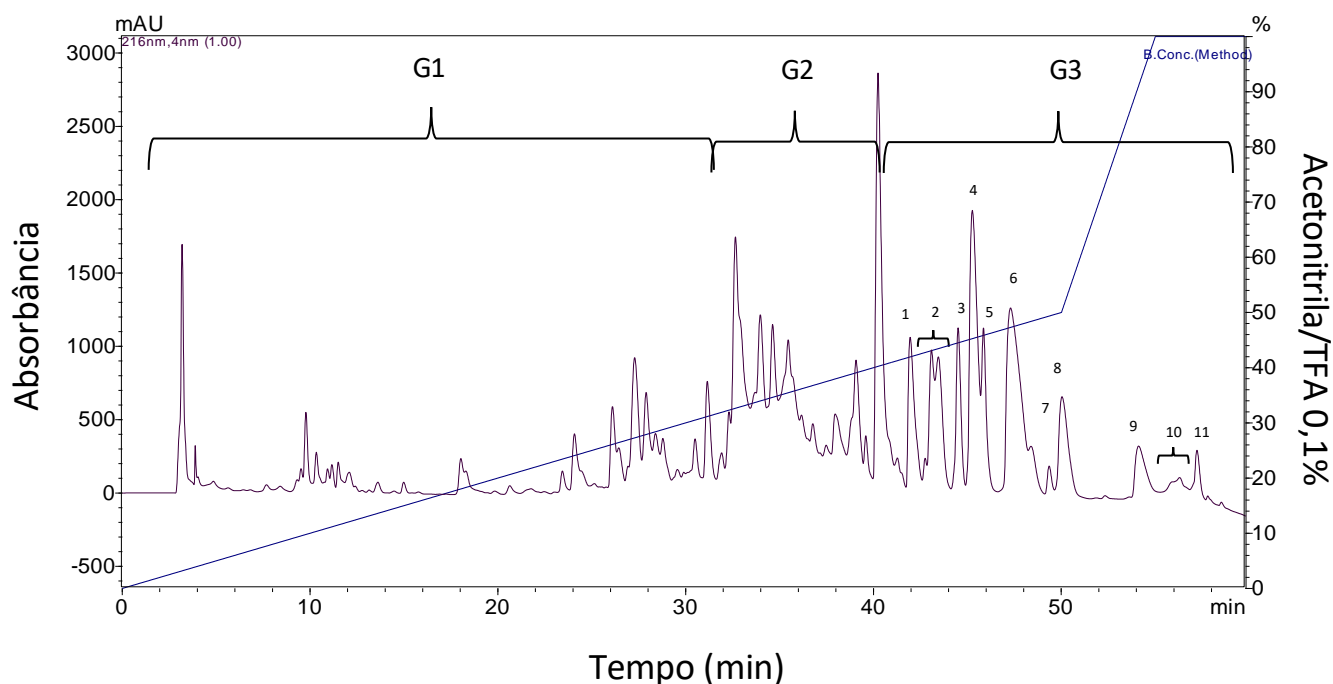


Figura 5. Cromatografia da secreção cutânea de *P. azureus*. Obtida por RP- utilizando um gradiente linear de acetonitrila em uma coluna analítica C18 de fase reversa (Vydac 218TP54, 250 mm x 4,5 mm, 5µm), a um fluxo de 1 ml/min. As chaves marcam os grupos denominados G1, G2 e G3. As frações do G3 estão enumeradas de 1 a 11 (denominadas PA1 à PA11). A separação cromatográfica foi monitorada em 216 nm.

5.1.2 Atividade fosfolipásica

Para encontrar a fração contendo fosfolipase, primeiramente fez-se o ensaio de atividade enzimática com os grupos G1, G2 e G3 obtidos com a cromatografia. Os resultados indicaram a presença de fosfolipase apenas no grupo G3 (**Figura 6A**).

Desta forma, as frações contidas no grupo G3, inicialmente denominadas PA1 à PA11, também foram submetidas ao ensaio enzimático. De acordo com os resultados obtidos, as frações PA2 e PA10 apresentaram atividade fosfolipásica, com um consumo de substrato equivalente a 80% (**Figura 6B**).

Assim, as frações contendo fosfolipase foram encontradas, sendo necessários outros ensaios para confirmar a presença desta enzima

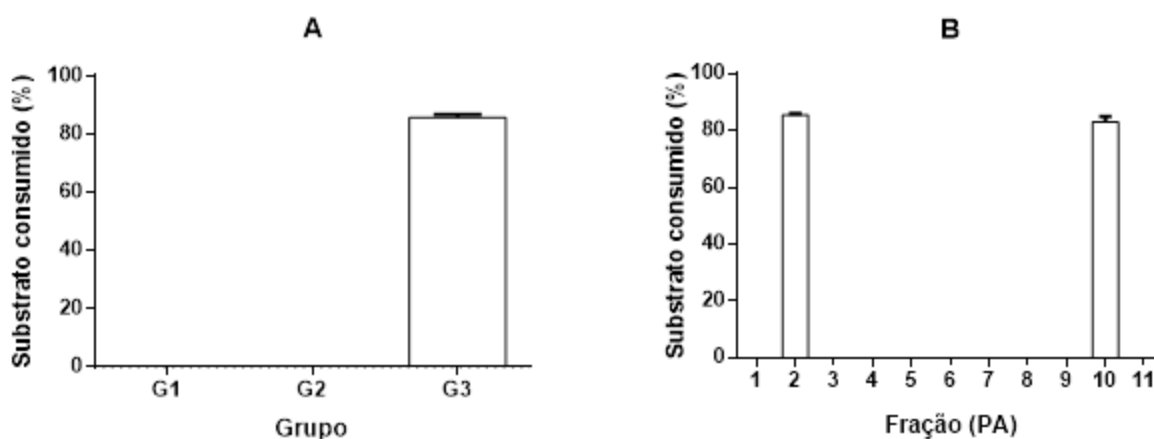


Figura 6. Atividade fosfolipásica preliminar. **(A)** Atividade fosfolipásica das frações agrupadas nos grupos G1, G2 e G3 obtidas pelo HPLC; **(B)** Atividade fosfolipásica das frações PA1 à PA11. A quantidade de material utilizado nestes ensaios foi referente à uma única corrida cromatográfica (com injeção de 200 µg da secreção bruta). A leitura do ensaio fosfolipásico foi realizada em 405 nm (Multiskan MCC/349, ThermoFisher Scientific), sendo a quantidade de substrato consumido após incubação da enzima por 60 minutos expresso em %.

As frações PA2 e PA10 foram então submetidas à análise por espectrometria de massa, para assim averiguar a presença de um componente com massa compatível com a de uma fosfolipase catalítica. As frações PA2 e PA10 apresentaram componente com massa entre 15 e 16 kDa (dados não mostrados).

Entretanto, a fração PA2 apresentou menos contaminantes e maior rendimento em relação a quantidade de proteína obtida pela cromatografia.

Desta forma, optou-se em trabalhar apenas com a fração PA2, que foi utilizada nas etapas posteriores deste trabalho.

5.1.3 Perfil Recromatográfico

Para dar continuidade ao processo de purificação da enzima, a fração PA2 foi recromatografada, obtendo-se a eluição de 3 frações bem distintas, as quais foram denominadas PA2.1, PA2.2 e PA2.3 (**Figura 7**). Estas três frações foram submetidas à uma nova espectrometria de massa, para averiguar onde, de fato, encontra-se o componente compatível com a fosfolipase, além de averiguar sua pureza.

As etapas de purificação da fosfolipase foram resumidas na **tabela 1**, onde é possível avaliar o rendimento de cada etapa cromatográfica.

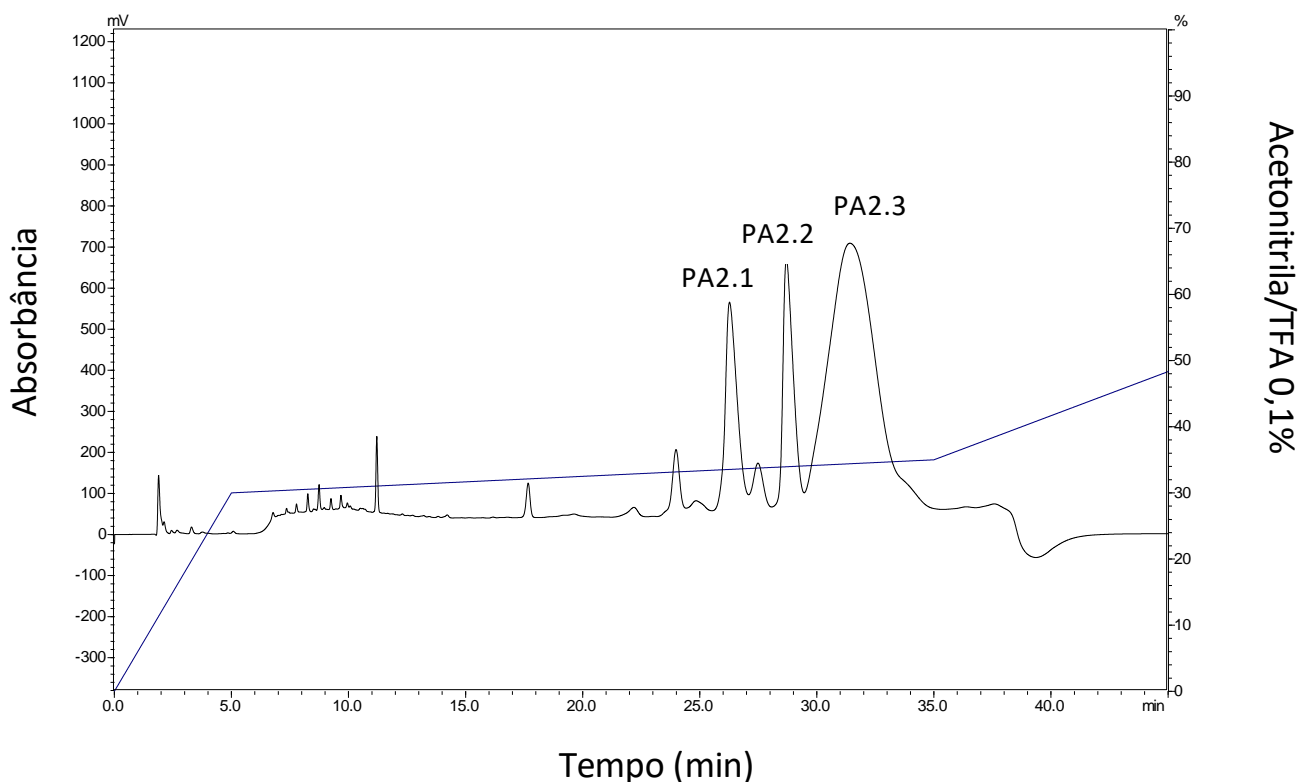


Figura 7. Recromatografia da fração PA2. Realizada em RP-HPLC em coluna analítica C₈ de fase reversa (Shim-pack CLC-C8 M) 150x4,5 mm, em que 3 picos eluíram (PA2.1, PA2.2 e PA2.3). A separação cromatográfica foi monitorada em 216 nm.

5.1.4 Tabela de purificação

As etapas de purificação da fosfolipase PA2.3 puderam ser descritas resumidamente pela tabela de purificação (**Tabela 1**), em que é possível analisar o quanto da proteína é recuperada entre uma etapa e outra de purificação, bem como seu rendimento (%).

Tabela 1 - Resumo da purificação da fosfolipase PA2.3 de *P. azureus*.

Etapas de purificação	Proteína	Atividade total	Atividade Específica	Fator de purificação	Rendimento (%)
Bruto	0,302	34,256	113,498	1,000	100,000
Cromatografia	0,133	31,755	238,490	2,101	92,697
Recromatografia	0,074	34,795	468,633	4,129	101,573

A tabela foi elaborada a partir da injeção inicial de 200 µl (de uma solução a 1,2 mg/ml) da secreção cutânea bruta no HPLC. A quantificação de proteína foi obtida por Bradford (1976), sendo expressa em mg. Atividade total expressa em U/ml; atividade específica em U/mg.

5.2 Análise da estrutura primária

5.2.1 (MALDI TOF/TOF)

As frações PA2.1 PA2.2 e PA2.3 foram analisadas em espectrometria de massa, realizada em modo refletido (na faixa de 500 a 5000 Da) e em modo linear (na faixa de 5000 a 50000 Da).

Os resultados obtidos em modo linear indicaram que a fração **PA2.3** apresentou o componente de **15388 Da**, sendo observado também um componente de 7681 Da, correspondendo a uma dupla carga, outro componente de 31320 Da, correspondendo a um dímero, e outro componente de 47305 Da, correspondendo a um trímero (**Figura 8**).

O modo refletido indicou a presença de um contaminante na faixa de 3200 Da (dados não mostrados), que exigiu uma terceira etapa de purificação para o ensaio biológico, por se tratar de um possível peptídeo com atividade

antimicrobiana. Assim, a amostra passou por um microfiltro, como descrito na metodologia, antes de ser submetido ao ensaio bacteriano.

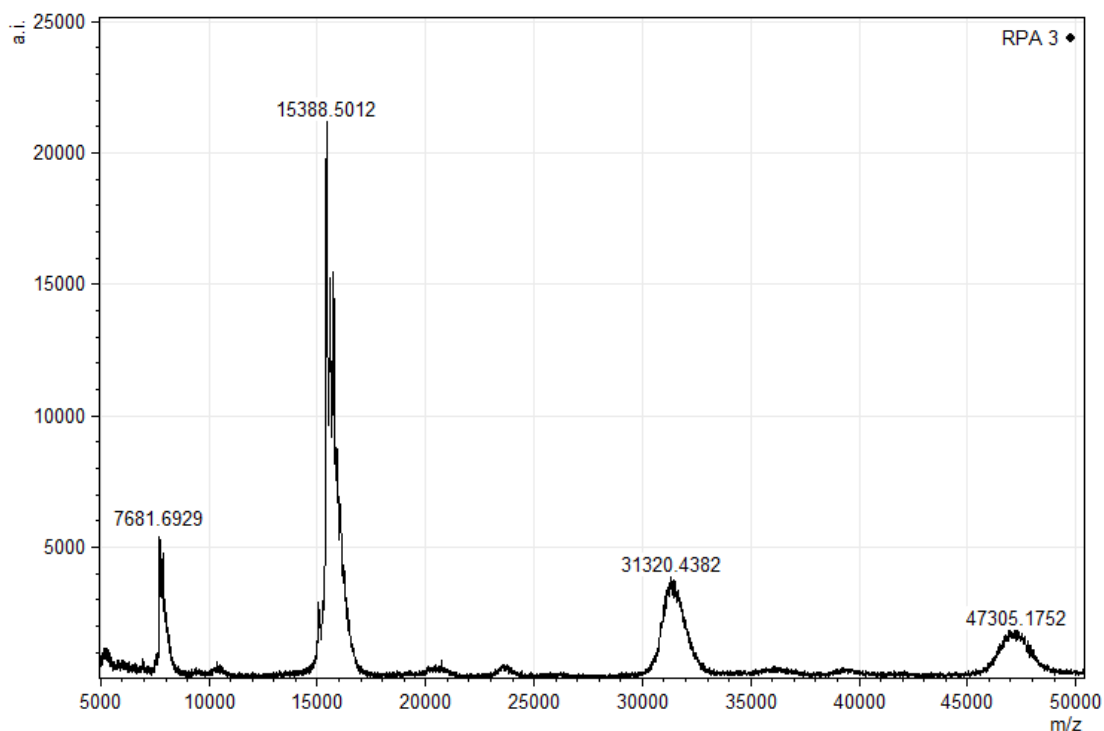


Figura 8. Espectrograma de massa da fração PA2.3. Os espectros foram obtidos plaqueando-se a amostra com ácido sinapínico 20 µg/µl e analisados em MALDI TOF/TOF, em modo linear na faixa de 5000 a 50000 Da.

5.2.2 LC-MS/MS (LTQ Velos Orbitrap Thermo Scientific)

5.2.2.1 Espectrograma de massa de alta resolução

O resultado obtido através da análise do espectro de massa LTQ-Orbitrap Velos Mass da fração PA2.3 (deconvoluido) apresentou um componente com variância de massa entre 15096,67 e 16347,16 Da (**Figura 9**). Observa-se que há um padrão de aumento de massa na faixa de 160 Da de um pico para outro que sempre se repete. Sugere-se se tratar de glicosilações.

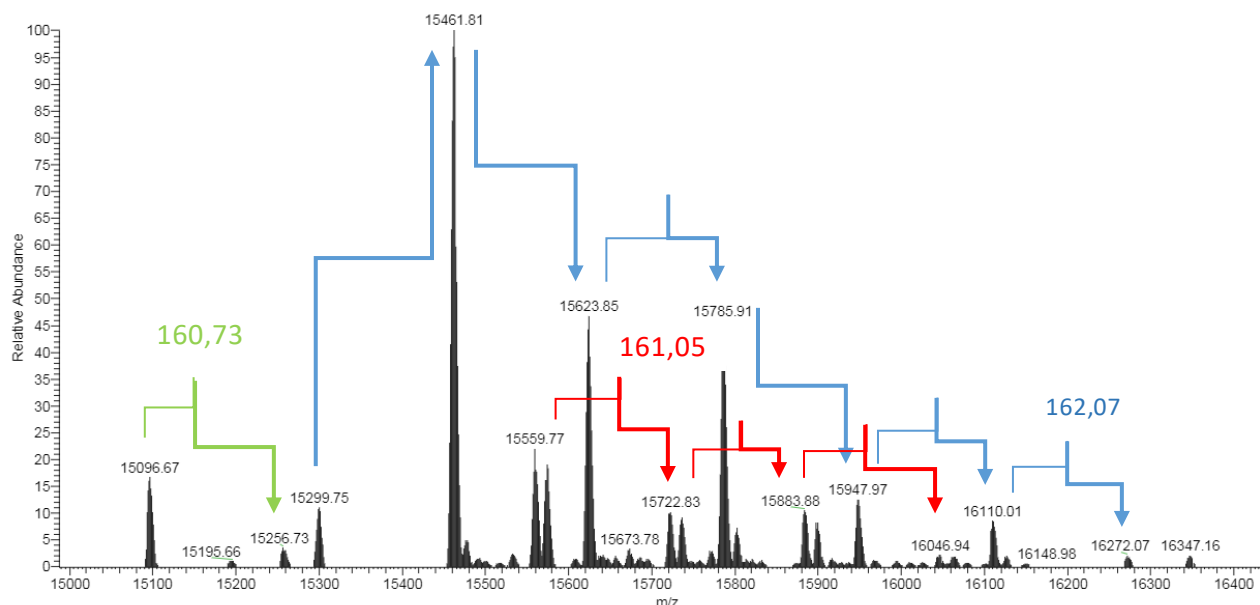


Figura 9 - Espectro de massa de alta resolução da fração PA2.3 obtida por Orbitrap. Os espectros foram obtidos aplicando injeção direta em LTQ-Orbitrap Veloss Mass (Thermo Fisher Scientific, Germany). As setas representam um padrão de variação de massa sempre em torno de 160 Da.

5.2.2.2 Sequenciamento *De Novo*

O sequenciamento *De Novo* da PLA2.3 foi realizado para a obtenção de informações sobre sua estrutura primária. A análise LC-MS/MS gerou um total de 1119 peptídeos sequenciados *De Novo*, que, após a busca por similaridade em um banco de dados de “fosfolipase”, apresentou similaridade com a fosfolipase da borboleta-monarca *Danaus plexippus*, embora alcançando apenas 12% de cobertura proteica (**Figura 10**).

Devido à baixa cobertura obtida com a fosfolipase de *D. plexippus*, outras sequências foram alinhadas no Clustal, obtendo-se similaridade com algumas sequências de fosfolipase A₂ das serpentes *Naja naja*, *Protobothrops tokarensis*, *Leioheterodon madagascariensis*, *Protobothrops elegans* e *Protobothrops flavoviridis* (**Figura 11A**).

Também houve similaridade com fosfolipases de mamíferos (*Homo sapiens* e *Cricetulus griseus*) e com o anfíbio *Rana rugosa* (Beak et al., 2000) (**Figura 11B**).

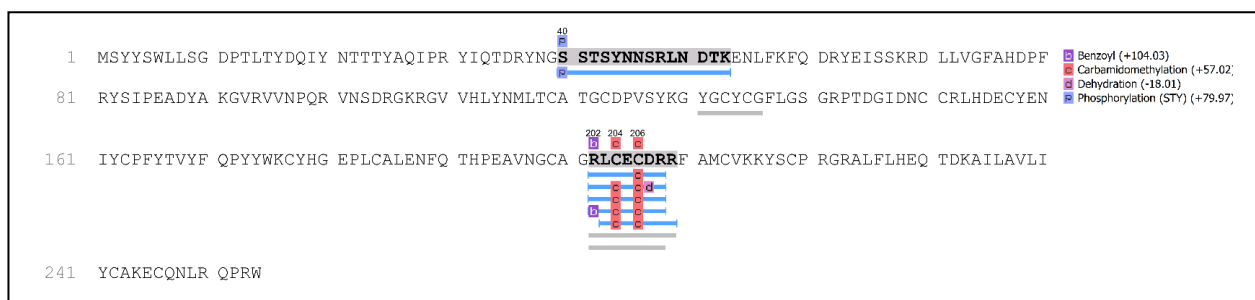


Figura 10. Sequência de aminoácidos da fosfolipase (PA2.3) de *P. azureus* optido pelo Peaks 7.0. As sequencias da PA2.3 apresentaram similaridade com a fosfolipase de *Danaus plexippus* (241 aa).

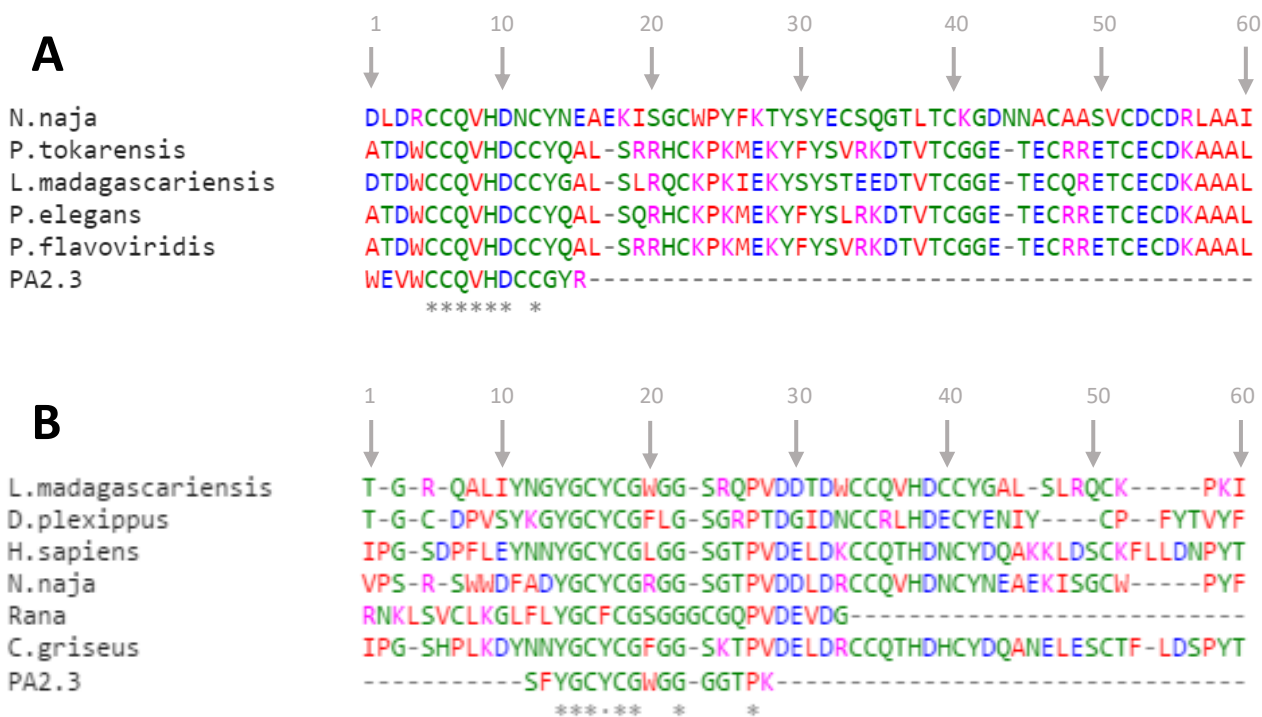


Figura 11. Comparação da sequência das PLA2s com as proteínas isoladas da secreção cutânea de *P. azureus*. Alinhamento múltiplo da sequência N-terminal da PLA2 utilizando o programa CLUSTALW2 no qual pode ser expresso a similaridade entre as estruturas das proteínas. **(A):** *Naja naja* (P15445), *Protobothrops tokarensis* (AOA0B4U8N5), *Leioheterodon madagascariensis* (IOBWSO), *Protobothrops elegans* (A0A0B4U9H9) e *Protobothrops flavoviridis* (A0A0B4U9E8). **(B)** *Homo sapiens*, (P04054), *Cricetulus griseus* (G3IGR7), *Rana rugosa* (Beak et al., 2000), *Danaus plexippus* (G6CSQ4), *Naja naja* e *Leioheterodon madagascariensis*.

5.3 Análises de estruturas secundárias

A estrutura secundária e a estabilidade da enzima fosfolipase foi avaliada por dicroísmo circular na região distante do ultravioleta (260-190 nm) no pH 8,5 e faixa de temperatura de 25 °C a 95 °C.

O perfil da estrutura secundária da fosfolipase em estudo foi calculado a partir de espectros gerados em 25 °C. Os valores calculados mostraram que a estrutura da enzima apresenta maior porcentagem de estrutura de α -hélices (47,68%), seguida por folhas betas (11,65%) (**Figura 12A**). O ensaio de desnaturação e os espectros dicroicos obtidos nas faixas de temperatura de 25 °C a 95 °C apresentaram diminuição do sinal na região de 222 nm, esta região corresponde a de estrutura de α -hélice nas proteínas (**Figura 12C**). A proteína apresentou temperatura de transição da conformação nativa para desnaturado em 65 °C, o que sugere a alta estabilidade estrutural da enzima (**Figura 12B**), corroborando os resultados nos ensaios bioquímicos de termoestabilidade.

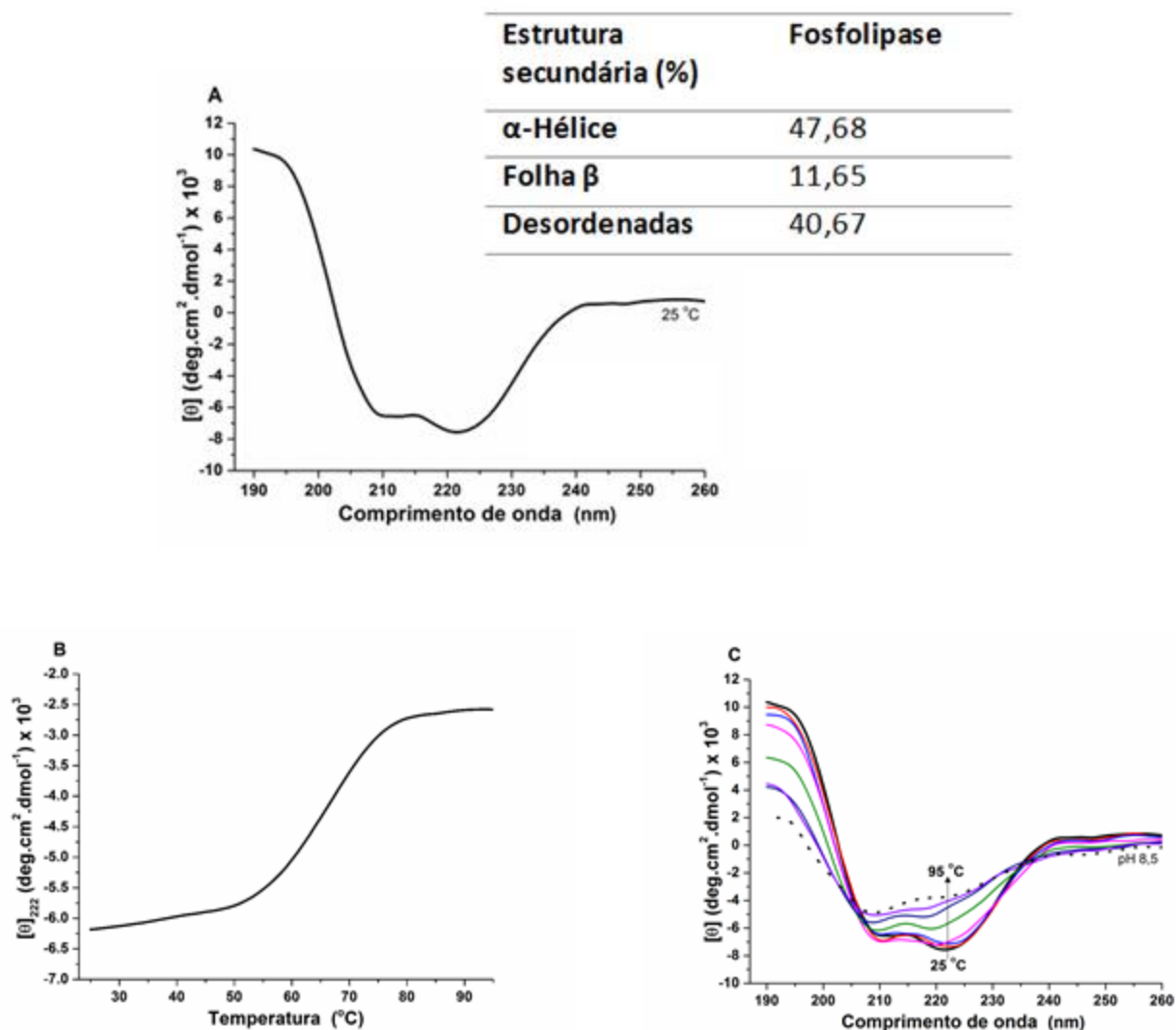


Figura 12. Efeito da temperatura na estrutura secundária e estabilidade estrutural da PA2.3 por dicroísmo circular. **(A)** Espectro de CD (260-190 nm) em tampão acetato de sódio e Tris HCl 2 mM na temperatura de 25 °C. **(B)** A curva de desnaturação térmica da PA2.3 foi monitorada em 222 nm apresentando desnaturação com aumento da temperatura. **(C)** A curva de desnaturação térmica da PA2.3 foi monitorada em 260-190 nm, com elevação de 10° em 10° C. A seta indica diminuição do sinal dicróico em 222 nm com o aumento da temperatura.

5.4 Caracterização enzimática

5.4.1 Determinação da concentração e tempo ideais

A determinação da concentração ótima de atividade foi realizada por diluição seriada, em que a quantidade inicial de amostra foi de 40 μg (2 mg/ml) e finalizou em 2,5 μg (0,125 mg/ml). A fosfolipase PA2.3 consumiu a fosfatidilcolina em todas as concentrações da enzima testadas, sendo que o maior consumo de substrato foi com 40 μg de enzima, e o menor, com 2,5 μg . Entretanto, considerou-se 10 μg (0,5 mg/ml) de amostra como a concentração ideal para atividade enzimática (**Figura 13A**).

O efeito do tempo sobre a atividade fosfolipásica foi analisado de acordo com a absorbância obtida na leitora de placa em intervalos de 10 em 10 minutos durante 100 minutos, utilizando a concentração ótima já pré-estabelecida. O consumo do substrato foi crescente com o passar do tempo, sendo que a atividade fosfolipásica foi mais intensa nos 40 primeiros minutos, em que o consumo foi 32%; decaindo até os 60 minutos, em que o consumo atingiu 38% e mantendo-se mínimo até 100 minutos, finalizando com o consumo de 40% (**Figura 13B**).

Desta forma, todos os demais ensaios de atividade fosfolipásica foram realizados com incubação de 60 minutos.

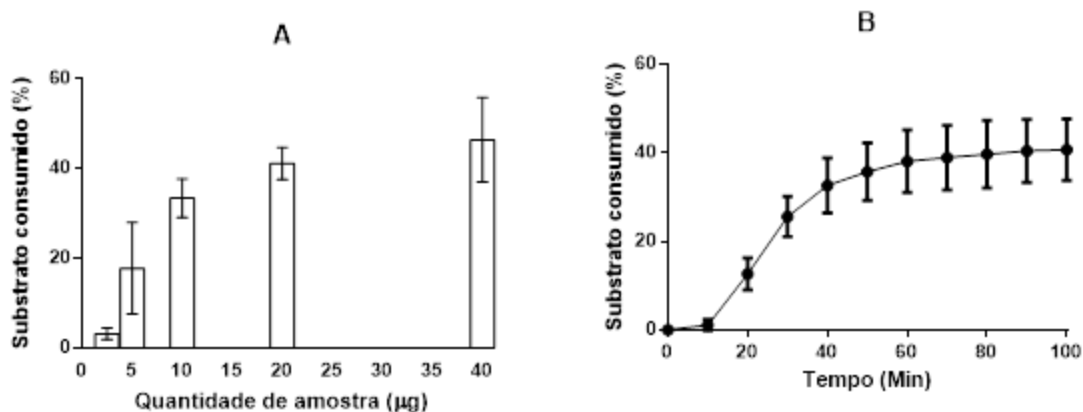


Figura 13 – Concentração de proteína e tempo de atividade enzimática. Figura **(A)** indica a concentração ótima de PLA2.3 para atividade enzimática, realizada por diluição seriada iniciada em 40 μg (2,0 mg/ml) de fosfolipase, sofrendo várias diluições até chegar a 2,5 (0,125 mg/ml) μg . Figura **(B)** indica o efeito do tempo sobre atividade fosfolipásica, em que a atividade fosfolipásica foi analisada em intervalos de 10 em 10 minutos durante 100 minutos. Utilizou-se 10 μg (0,5 mg/ml) da enzima. Os resultados foram baseados no % de substrato consumido. A leitura da placa foi realizada em 405 nm (Multiskan MCC/349, ThermoFisher Scientific).

5.4.2 Efeito do íon divalente na atividade fosfolipásica

Para a análise do efeito do cálcio (Ca^{2+}) na atividade da enzima estudada utilizou-se um quelante (EDTA - ácido etilenodiaminotetracético), uma vez que os sais de EDTA se ligam ao cálcio, impedindo que ele se ligue à fosfolipase.

Assim, a fosfolipase que foi submetida ao quelante não apresentou atividade catalítica, e, portanto, não houve degradação de substrato. O contrário pode ser observado na fosfolipase que não foi incubada com EDTA e que apresentou atividade fosfolipásica (**Figura 14**).

Efeito do íon Ca^{2+} sobre atividade fosfolipásica

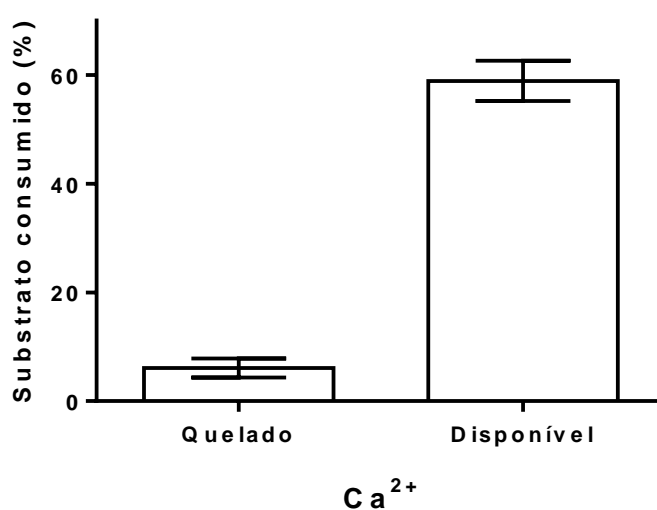


Figura 14 – Efeito do íon Ca^{2+} sobre a atividade fosfolipásica. Análise da atividade fosfolipásica com disponibilidade do íon cálcio (disponível) e quelado por meio do EDTA 0,2 M (quelado) com base no percentual de substrato consumido após incubação da enzima com substrato por 60 minutos.

5.4.3 Efeito do pH sobre a atividade fosfolipásica

A fosfolipase foi testada em diferentes condições a fim de determinar o seu pH ótimo de atividade. Para isto, incubou-se a enzima em pH variando de 6,5 a 10,0 e observou-se o % de consumo do substrato.

De acordo com os resultados, houve maior atividade enzimática na faixa de pH entre 7,5 e 8,5, sendo 8,5 o pH em que a atividade desta fosfolipase foi maior (**Figura 15**).

Efeito do pH sobre atividade fosfolipásica

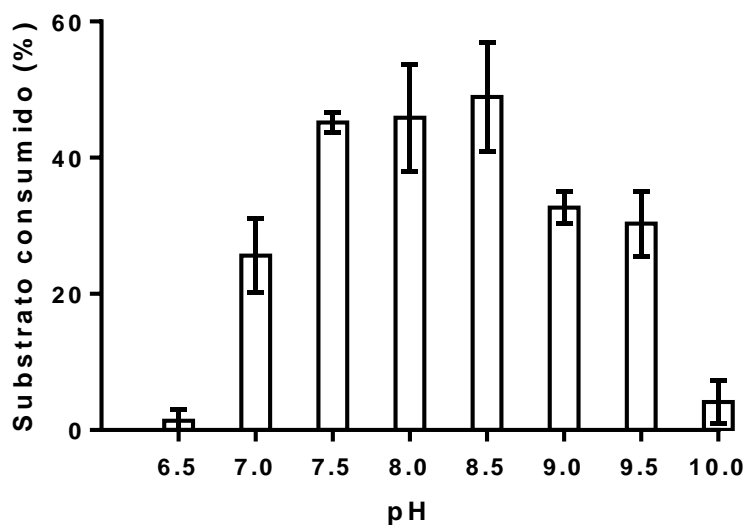


Figura 15 – Efeito do pH sobre a atividade fosfolipásica. Análise da atividade fosfolipásica em pH variando de 6,5 a 10,0, cujos resultados basearam-se no % de substrato consumido após incubação da enzima com substrato por 60 minutos.

5.4.4 Efeito da temperatura sobre a atividade fosfolipásica

A fosfolipase foi testada em diferentes temperaturas a fim de determinar a temperatura em que a atividade fosse maior. Para isto, incubou-se a enzima por 60 minutos em temperaturas variando de 1° C a 100° C e observou-se percentual de consumo do substrato.

Os resultados obtidos indicaram atividade fosfolipásica em todas as temperaturas nas quais a enzima fora submetida (**Figura 16**). Entretanto, de acordo com as análises estatísticas (ANOVA com pós teste b de Tukey) pode-se inferir que a atividade fosfolipásica obtidas nas temperaturas entre 20° a 60° C foi significante maior que nas outras temperaturas testadas.

Desta forma, a temperatura de 35° C foi utilizada nos demais ensaios, pois apresentou uma diferença de atividade significante maior quando comparada as demais temperaturas.

Efeito da temperatura sobre atividade fosfolipásica

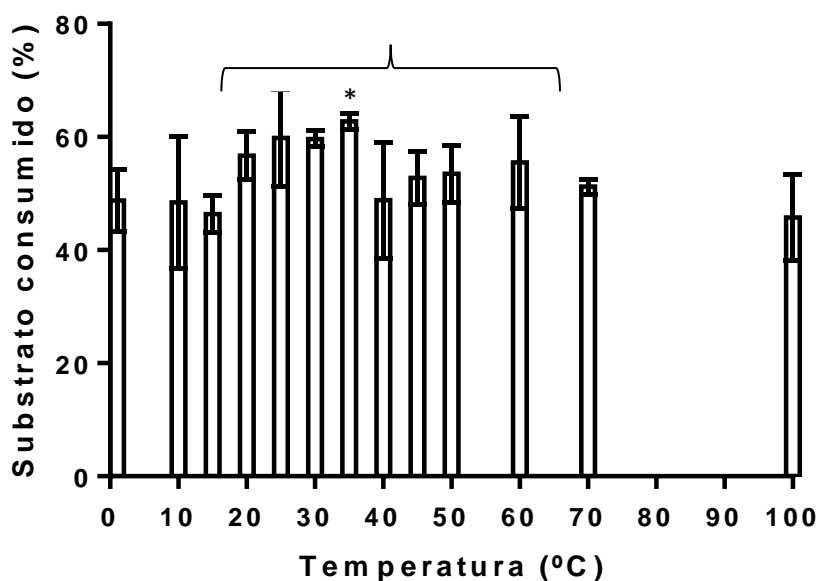


Figura 16. Efeito da temperatura sobre a atividade fosfolipásica. Análise da atividade fosfolipásica em diferentes temperaturas variando entre 1° C a 100° C, em tampão com pH 8,5, avaliando o % de substrato consumido após incubação da enzima com substrato por 60 minutos. Sob as chaves destaca-se a faixas de temperatura em que a atividade fosfolipásica foi significante maior, sendo (*) a temperatura em que a atividade foi significante maior em relação às demais, de acordo com as análises estatísticas, em que, para temperaturas de 1°, 10°, 15°, 40° e 100°, $p=0$; 20° $p = 0,62$; 25° $p = 0,99$; 30° $p = 0,99$; 45° $p = 0,30$; 50° $p = 0,63$; 60° $p = 0,50$; 70° $p = 0,05$ (ANOVA com pós teste b de Tukey).

5.4.5 Constante de Michaelis-Menten (K_m e V_{max})

Para determinar a constante de Michaelis-Menten, 10 μg de fosfolipase (0,059 mg/ml) foram incubados com quantidades crescentes de fosfatidilcolina, variando de 0 a 10 mM, em condições ótimas de pH (8,5) e temperatura (35°C). O K_M encontrado foi de 4,280 mM, o K_{cat} 12,30 min^{-1} , e a V_{max} foi de 0,081 mM/min (**Figura 17**).

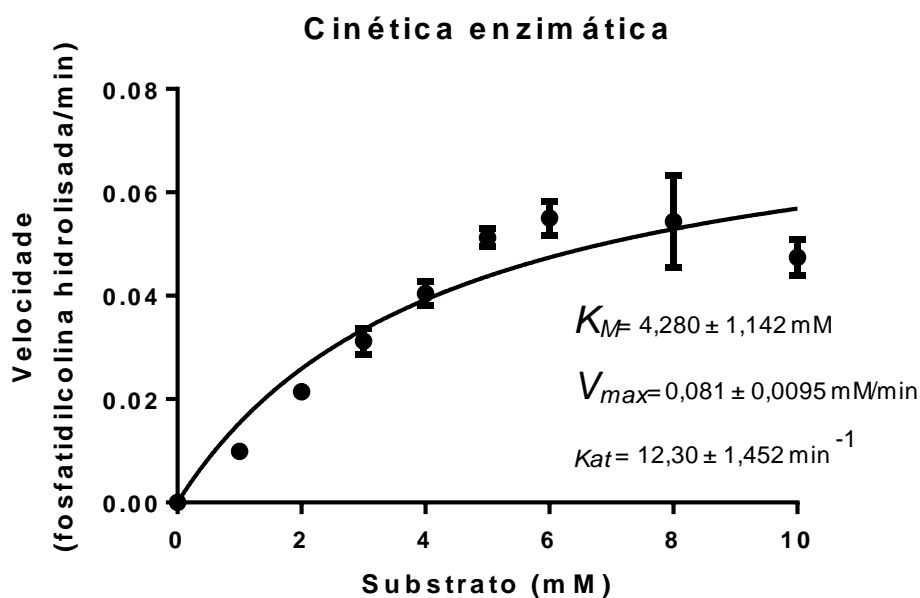


Figura 17. Constante de Michaelis-Menten. A atividade enzimática foi estimada de acordo com a diminuição da absorbância devido ao consumo da fosfatidilcolina (Sigma) pela fosfolipase. As leituras de absorbâncias foram realizadas em 595 nm.

5.5 Ensaio biológico

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da fosfolipase foi avaliada contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, pelo método de diluição em meio líquido (**Figura 18**).

A PLA₂ se mostrou mais efetiva contra Gram-Negativa, em que os percentuais de inibição de crescimento foram em torno de 60% para as concentrações entre 1 e 16 μ M. Seu efeito contra Gram-Positiva foi inferior, em que os percentuais de inibição foram em torno de 50% nessas mesmas molaridades.

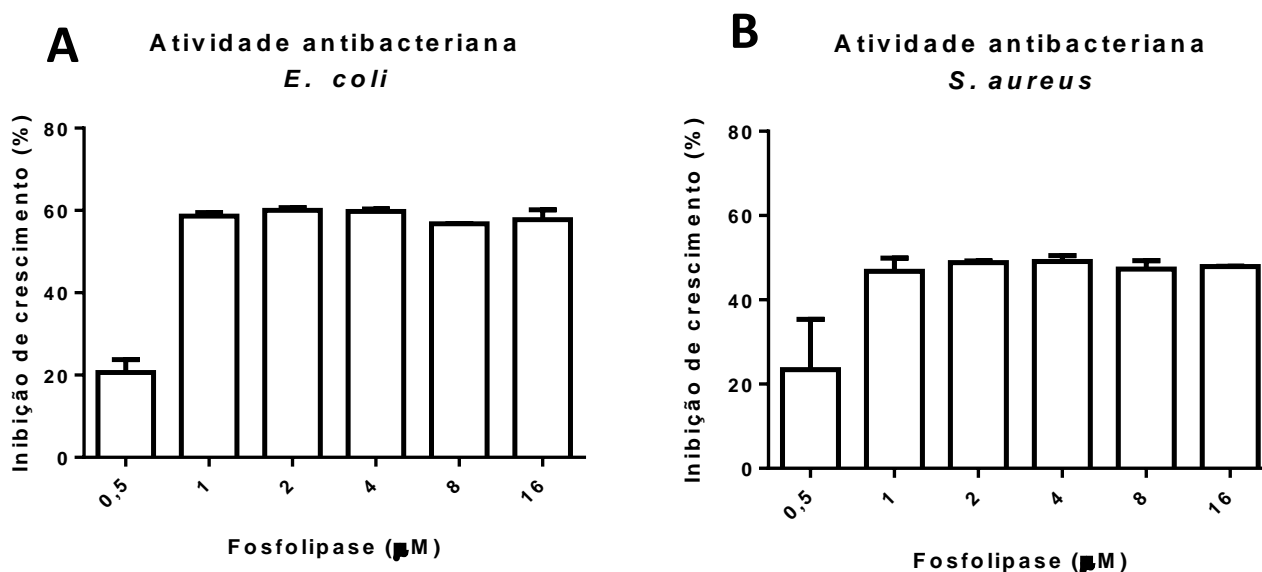


Figura 18. A atividade antimicrobiana da fosfolipase. A PA2.3 foi testada contra (A) *E.coli* e contra (B) *S.aureus*. A diluição seriada iniciou com 64 μ M da enzima (59 ug) e terminou em 0,5 μ M (0,46 ug). A leitura foi realizada em 595 nm.

6. DISCUSSÃO

A secreção cutânea dos anfíbios é essencial para a sobrevivência deste animal em diversos habitats, uma vez que ela ajuda a manter a superfície de pele úmida e escorregadia, evitando danos mecânicos; exerce uma proteção dos efeitos nocivos ocasionados pelo contato prolongado com água; retarda a perda de água por evaporação (Elkan, 1968), além de possuir efeito antimicrobiano e antifúngicos patogênicos, sendo as glândulas granulares responsáveis pela síntese de uma vasta gama de compostos químicos (proteínas, peptídeos, aminas, esteróides e alcalóides) que fornecem proteção contra a infecção bacteriana e fúngica, e contra predadores (Clarke, 1997).

A secreção cutânea de *Pithecopus azureus* tem se mostrado como uma fonte rica de moléculas de interesse biotecnológico, uma vez que já foram encontrados 41 peptídeos, apresentando um largo espectro de atividades antimicrobiana, neuroativa e sobre o músculo liso (Calderon *et al.*, 2011).

De acordo com Conceição e colaboradores (2007), também fazem parte da composição da secreção cutânea de *P. azureus* enzimas potencialmente ativas, como proteases, que podem estar envolvidas na geração de peptídeos bioativos; e fosfolipases, que possivelmente apresentam atividade antimicrobiana tão importante quanto dos peptídeos que compõem sua secreção cutânea.

6.1 Perfil cromatográfico

O fracionamento de moléculas por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) é baseada na relação de hidrofobicidade entre os compostos e a matriz cromatográfica.

O presente trabalho apresentou, pela primeira vez, o isolamento de uma fosfolipase A₂ da secreção cutânea do anfíbio *Pithecopus azureus*, sendo este obtido por dois passos cromatográficos.

Primeiramente a secreção bruta foi submetida a cromatografia em fase reversa (RP-HPLC) em coluna C₁₈, sob gradiente linear de acetonitrila. A cromatografia apresentou cerca de 45 frações que eluíram ao longo dos 60 minutos da cromatografia (**Figura 5**).

Para a segunda etapa de purificação (recromatografia em fase reversa, em coluna C8) e para as demais etapas deste trabalho, optou-se por escolher a fração PA2, uma vez que apresentou componente com massa molecular característica de fosfolipase, apresentou maior grau de pureza após cromatografia, e que rendeu mais material.

A fração PA2 eluiu em um pico bem definido, com concentração de acetonitrila aproximada a 40%. Resultados similares já foram observados para o isolamento de PLA₂s de veneno de serpente, por meio de RP-HPLC, em que o perfil de eluição destas proteínas saiu entre 30 e 40% de acetonitrila (Stábeli *et al.*, 2012). De acordo com Skinner e colaboradores (1990), na região mais hidrofóbica concentram-se normalmente os compostos de massa molecular maiores, sendo geralmente, proteínas.

Dando prosseguimento ao trabalho, a fração PA2 foi recromatografada com a finalidade retirar os contaminantes. O resultado foi a eluição de 3 picos bem definidos (**Figura 7**), denominados PA2.1, PA2.2 e PA2.3.

As três frações foram analisadas em espectrometria de massas, em que os resultados indicaram a presença de um componente de massa 15388 Da na fração PA2.3, sendo esta correspondente a fosfolipase. (**Figura 8**).

De uma forma resumida, os processos da purificação da fosfolipase A₂ da secreção cutânea de *P. azureus* puderam ser analisados na tabela de purificação (**Tabela 1**). De acordo com os resultados, a secreção cutânea bruta apresentou uma quantidade maior de proteínas quando comparada às etapas subsequentes, devido à possível presença de outras proteínas. Pode-se observar também que a atividade enzimática total manteve-se constante entre as etapas de purificação (entre 31,75 e 34,75 U/ml), aparentando uma estabilidade da enzima mediante aos processos de cromatografia e liofilização.

Observou-se também que a atividade específica foi maior na recromatografia (468,6 U/mg) quando comparada com o bruto (113,4 U/mg) e cromatografia (238,4 U/mg), uma vez que a quantidade de proteína se apresentou menor, entretanto, a atividade enzimática permaneceu a mesma. Isto é esperado, já que a medida que a fração é purificada, a concentração de enzima necessária para catalisar a mesma concentração de substrato fica menor, uma

vez que na amostra contendo apenas enzima, sem outros componentes da secreção cutânea, todas as moléculas serão ativas.

Desta forma, ao observar o fator de purificação da enzima, entende-se que na recromatografia a fosfolipase apresentou-se mais pura em relação às demais etapas.

6.2 Análise da estrutura primária

A análise por espectrometria de massa da amostra recromatografada PA2.3 apresentou uma massa molecular de aproximadamente 15388 Da (**Figura 8**). Esta massa molecular está condizente com a maioria das PLA2s secretadas de diversos organismos, incluindo serpentes, alguns tecidos de mamíferos, bactérias e fungos simbióticos a qual varia entre 13 a 19 kDa (Schaloske & Dennis, 2006). Além disso, observou-se a presença de uma dupla carga (7681 Da), um dímero (31320 Da), e um trímero (47305 Da), que, segundo Arni e Ward (1996) é característico desta enzima, uma vez que esta apresenta tendência a formar agregados.

Em relação à análise do espectro de massa de alta precisão obtida pelo LTQ-Orbitrap Velos Mass, observou-se um padrão de variação entre 15096,67 e 16347,16 Da da massa da fosfolipase (**Figura 9**). Evidenciou-se que os picos apresentam um acréscimo consecutivo de um componente de massa aproximado de 162 Da. De acordo com a literatura, essa massa é compatível a hexoses em sua forma nativa, um dos monossacarídeos mais comuns em glicosilações (Morelle & Michalski, 2007), sendo abundantemente encontrado na peçonha de *Crotalus durissus* (Santoro et al, 1999). Assim, sugere-se que as diferentes massas são de uma mesma fosfolipase, a qual apresenta sequência única de aminoácidos, entretanto, com várias glicosilações, obtendo-se assim, uma família de enzimas glicosiladas.

Glicosilação é uma das modificações pós-traducional mais observada e estruturalmente diversa que pode ocorrer em uma proteína. Animais, plantas, fungos e bactérias possuem habilidade de glicosilar proteínas, entretanto, o tipo de carboidrato produzido e os monossacarídeos utilizados são bastante diferentes entre esses grupos (Easton, 2011). Nilsson (1994) constatou que os

monossacarídeos estão envolvidos na atividade da proteína. De acordo com seus estudos, a desglicosilação de algumas enzimas resultou no aumento da atividade específica, por outro lado, em outros casos, houve diminuição desta atividade.

A partir deste fato, entende-se que a presença de carboidratos interfere na atividade enzimática, assim como ocorreu com as atividades catalíticas das PLA₂s extraídas da peçonha de abelha, que foi afetada pela n-glicosilação da enzima (Hiraoka *et al* 2013).

Desta forma, supõe-se que a atividade enzimática da PLA₂ pode ser aumentada, diminuída ou permanecer a mesma dependendo do tipo de monossacarídeo que é glicado à proteína. Além disso, cada fosfolipase pode apresentar um comportamento diferente quando glicado a um mesmo monossacarídeo.

Entretanto, a glicosilação tem mostrado vários papéis biológicos que vão além de influenciar na atividade enzimática, tal como o direcionamento da glicoproteína para receptores específicos intra e intercelular; auxiliar no enovelamento da proteína (Easton, 2011), influenciando, deste modo, na estrutura tridimensional da proteína (Nilsson, 1994).

Além disso, outro papel biológico da glicosilação é a proteção contra clivagens proteolíticas, uma vez que o tamanho físico dos glicanos podem impedir a ação de proteases; e ainda, a sequencias de alguns sacarídeos podem apresentar ação imunogênica (Lipniunas *et al*, 1993). Desta forma, os sacarídeos ligados à PA2.3 podem estar desempenhando um papel biológico tanto com o anfíbio, atuando contra micro-organismos, quanto com a enzima, atuando em sua atividade.

Com o propósito de obter a sequência primária da PLA₂ de *P. azureus*, digeriu-se a proteína com tripsina e, posteriormente, fez-se a análise dos peptídeos resultantes por espectrômetro de massa do tipo MALDI TOF/TOF e LTQ-Velos Orbitrap.

Os dados gerados de MS e MS/MS foram confrontados com banco de dados público (Uniprot) com mais de 7000 entradas para “fosfolipase” oriundas de diversos organismos, sendo a busca de similaridades realizada com o software PEAKS 7.

Entretanto, considerando os parâmetros de busca especificados na metodologia, a PLA₂ de *P. azureus* apresentou pouca similaridade com as fosfolipase obtidas no banco de dados, apresentando maior similaridade com peptídeos da borboleta *D. plexippus*, entretanto com apenas 12% de cobertura proteica (**Figura 10**).

Apesar deste fato, também houve similaridade com alguns fragmentos da PLA₂ de serpentes. Entretanto, não se pode afirmar que a estrutura primária da PLA_{2.3} seja mais próxima à PLA₂ de répteis, pois, da mesma forma, apresentou alguma similaridade com fosfolipase de mamíferos (**Figura 11**).

Confrontou-se os dados obtidos de *P. azureus* com a fosfolipase *Rana rugosa*, o único anfíbio a qual se tem algum sequenciamento da fosfolipase descrito. Houve pouca similaridade, uma vez que o sequenciamento que se tem na literatura de *Rana* é parcial, com cerca de 40 aminoácidos (Beak *et al.*, 2000).

6.3 Análise da estrutura secundária.

O perfil da estrutura secundária da fosfolipase em estudo foi calculado a partir de espectros gerados em 25 °C (**Figura 12**). Os resultados mostraram que a estrutura é centrada em α -hélices, com percentual predominante de 47,68%, seguida por folhas betas (11,65%).

De acordo com a literatura, α -hélices em maior percentual é característica das fosfolipases A₂, como observado na estrutura secundária de PLA₂ de *Daboia russelli* com 47% de α -hélices e 9% de folhas betas; PLA₂ de *homo sapien*, 46% de α -hélices e 7% de folhas betas (Giordanetto *et al.*, 2016; Dileep *et al.*, 2011). Fosfolipases A₁ apresentam em sua estrutura secundária percentual de folhas betas maior em relação ao de α -hélices.

A análise da estrutura secundária de PA_{2.3} sob aumento de temperatura mostrou que houve mudança conformacional na estrutura da proteína, (**Figura 12 C**), devido à diminuição do sinal dicróico na região de 222 nm, sendo esta uma região que configura estrutura de α -hélice.

Entretanto, a variação da temperatura (**Figura 16**), não interferiu na atividade enzimática, uma vez que a PA_{2.3} apresentou atividade residual em todas as faixas de temperatura testadas (entre 1°C e 100 °C). Desta forma,

sugere-se que a alteração conformacional da proteína causada pelo aumento da temperatura não interferiu na estrutura do seu sítio catalítico, mantendo sua atividade biológica.

6.4 Atividade fosfolipásica e cinética enzimática

Fosfolipases do tipo A₂ são enzimas encontradas nos venenos e peçonhas de vários animais. Essas enzimas desempenham um papel fundamental em vários processos fisiológicos, pois estão envolvidas em uma cascata de ativação oriundas da hidrólise de fosfolipídeos da membrana celular (Gijón & Leslie, 1999). Entretanto, o envolvimento desta enzima nestes processos fisiológicos não está necessariamente apenas ligado à sua atividade catalítica. As fosfolipases catalíticas apresentam o resíduo Asp49, sendo este responsável pela fixação do substrato ao sítio enzimático e pela atividade catalítica destas enzimas (Arni & Ward, 1996; Scott et al, 1990).

A atividade enzimática da fosfolipase obtida da secreção cutânea de *P. azureus* foi testada utilizando a emulsão de ovo para os ensaios iniciais (**Figura 6**), e fosfatidilcolina para os demais ensaios, uma vez que há maior especificidade de fosfolipases A₂ à fosfatidilcolina, quando comparado a outros substratos, (Rodrigues et al, 2007; Singer et al, 2002). Desta forma, a atividade enzimática da fosfolipase foi medida de acordo com a diminuição da absorbância pelo espectrofotômetro devido ao consumo de lipídeos.

As PLA₂ secretadas são enzimas que têm uma histidina no sítio ativo e requerem a presença de Ca²⁺ para a catálise (Valentin et al, 2000; Schaloske & Dennis, 2006; Stábeli et al, 2012). Desta forma, a dependência do íon Ca²⁺ pela fosfolipase pôde ser avaliada utilizando um quelante EDTA (**Figura 13**). Os resultados mostraram que quando adicionado o quelante, o íon não se ligou ao sítio ativo da enzima, que perdeu sua atividade catalítica, pois o íon Ca²⁺ direciona o posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima (Murakami et al, 2006). Desta forma, pode-se afirmar que a fosfolipase em estudo é dependente de cálcio.

Para o estudo da cinética enzimática, a determinação de pH e temperaturas ideais são imprescindíveis, pois a seleção das condições adequadas para seu ótimo desempenho na catálise enzimática possibilita o

conhecimento de seu funcionamento e permite prever o comportamento das enzimas em organismos vivos. Desta forma, incubou-se a fosfolipase em diferentes pHs e avaliou-se sua atividade enzimática.

De acordo com os resultados obtidos, houve maior atividade enzimática na faixa de pH entre 7,0 e 9,5, sendo 8,5 o pH em que atividade da PA2.3 foi maior (**Figura 15**). Observou-se que em pH mais ácidos (abaixo de 7,0) a atividade enzimática foi drasticamente reduzida, assim como em pH mais alcalino (acima de 10,0). De acordo com a literatura, há uma grande variância da faixa de pH entre as PLA₂ descritas, sendo bastante observado atividades enzimáticas entre os pHs 7 a 9 (Huang & Mackessy, 2004).

O pH do meio influencia vários aspectos das enzimas, desde o seu estado de ionização a ionização dos aminoácidos do centro ativo e, em casos extremos, à desnaturação. Os pHs extremos podem causar alteração nas cargas da enzima, provocando modificações na estrutura tridimensional, podendo causar influência na interação da enzima com o substrato e, conseqüentemente, a perda da atividade enzimática.

Em relação a temperatura ótima, os resultados indicaram que a fosfolipase PA2.3 é termoestável, pois apresentou atividade catalítica em todas as temperaturas testadas (entre 1 e 100^o C). Apesar disso, a temperatura com maior atividade desta enzima foi, de acordo com as análises estatísticas, 35 ^oC (**Figura 16**).

De acordo com a literatura, fosfolipase A₂ geralmente apresentam maior atividade em temperaturas entre 30^o e 40^o C (Mansfeld & Ulbrich-Hofmann, 2007). Entretanto, constatou-se na literatura fosfolipase de serpente estável à 100^o C, como a PLA₂ de *Naja Naja Naja*, a qual apresentou alta estabilidade a temperaturas extremas (Kini, 1997).

Segundo Dennis (1997), as PLA₂s oriundas de peçonha de serpentes são proteínas consideravelmente pequenas e que contém entre 5 a 6 pontes dissulfetos. Tais características podem estar relacionadas com a alta resistência destas enzimas à desnaturação (Grotendorst & Hessinger, 2000). PLA₂s da peçonha de serpentes e do tecido pancreático de mamíferos são conhecidas por serem as enzimas mais estáveis já descritas (Deems & Dennis, 1975; De Haas *et al*, 1968).

Além disso, de acordo com West (1986) as cadeias laterais de carboidratos apresentam efeitos nas propriedades físicas da proteína, incluindo solubilidade e estabilidade térmica. Considerando que a fosfolipase deste trabalho pode apresentar glicosilações, é relevante associar tal fato com sua termoestabilidade apresentada nos ensaios.

O efeito da concentração do substrato na velocidade da reação catalisada pela fosfolipase em estudo permitiu a determinação da constante de Michaelis (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}). Analisando o gráfico (**Figura 17**), conclui-se que o mesmo exibe um comportamento típico da cinética de Michaelis-Menten, em que há uma dependência hiperbólica da velocidade de ação em função da concentração de substrato, sem aparente tendência sigmoidal.

A velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) corresponderam a 0,081mM/min e 4,28 mM, respectivamente. Outro parâmetro cinético obtido foi o K_{cat} , ou *turnover*, igual à 12,30 min⁻¹. A quantidade de fosfolipase utilizada no ensaio foi de 10 µg (0,5 mg/ml).

Em concentrações mais baixas de substrato, observou-se um aumento da velocidade (V) quase linear à medida que a concentração do substrato [S] aumentava. Em concentrações de substratos mais altas, a velocidade aumentou lentamente. Quando o aumento da velocidade foi mínimo à medida que [S] aumentava, a velocidade (V) formou um platô. Neste ponto (V) está próximo da velocidade máxima (V_{max}). De acordo com Nelson & Cox (2002), $[K_m]$ equivale à [S] quando V for metade de V_{max} .

Bacha e colaboradores (2011) avaliaram a cinética enzimática de uma PLA₂ purificada do pâncreas da raia *Dasyatis pastinaca*, em que seu K_m foi equivalente à 17 mM. Hu e colaboradores (2009) avaliaram uma PLA₂ oriunda do platelminto *Clonorchis sinensis*, em que seu K_m foi igual à 3,34 mM. Kemparaju e colaboradores (1994) purificaram uma PLA₂ do veneno da serpente *Echis carinatus* e encontraram o K_m igual à 0,25 mM. Egger *et al.* (1997) purificaram uma PLA₂ oriunda do mamífero *Sus scrofa* e encontraram K_m 4,9 mM. Todos esses trabalhos citados utilizaram como substrato a fosfatidilcolina.

A comparação detalhada entre os resultados de cinética obtidos neste trabalho com o encontrado na literatura não foram feitos de forma detalhada,

uma vez que para os ensaios de PLA₂s, pequenas variações na técnica incluindo o pH, a escolha do substrato e a preparação do substrato tornam as comparações inexatas (Price III, 2006).

Assim, de acordo com a literatura citada previamente, o K_m da PLA₂ de *P. azureus* foi inferior aos K_m s das PLA₂s dos mamíferos, porém superior aos dos demais animais. O K_m inferior pode ser um indicativo de elevada afinidade com o substrato, uma vez que uma menor concentração do substrato foi necessária para alcançar os valores de $V_{máx}$. (Nelson & Cox, 2002).

Não há, na literatura trabalhos descrevendo a constante de Michaelis-menten de uma PLA₂ secretada em anfíbios.

6.5 Atividade biológica

A atividade antimicrobiana de PLA₂s é amplamente conhecida e discutida na literatura. Estudos têm demonstrado que diversas fosfolipase A₂ apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e também contra Gram-negativa (Buckland & Wilton, 2000). Entretanto, não é regra para todas as PLA₂s apresentarem esta atividade.

A atividade antimicrobiana da fosfolipase PA2.3 foi avaliada contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (**Figura 18**). Os resultados mostraram maior efetividade contra Gram-negativa, com percentuais de inibição de crescimento em cerca de 60% quando comparada com a efetividade contra Gram-positiva, em que os percentuais de inibição foram em cerca de 50%.

As concentrações utilizadas para os ensaios foram estabelecidas por diluição seriada. Entretanto, mesmo diluindo-se a dose inicial 4 vezes, o percentual de inibição manteve-se aproximado a 60% para *E. coli* e 50% para *S. aureus*. Desta forma, a dose mais efetiva para ambas as linhagens foi de 1 µM (0,92 µg). Experimentos realizados com toxinas botrópicas demonstraram que algumas fosfolipases A₂ são capazes de eliminar 50% das unidades formadoras de colônias com doses de apenas 3µg (Chioato *et al.*, 2012).

A inibição de crescimento de *S. aureus* pela fosfolipase de *P. azureus* foi discretamente inferior a *E. coli*, pois *S. aureus* pode ter mantido a síntese de fosfolipídios mesmo sob atividade fosfolipásica, uma vez que ela apresenta tal

capacidade (Buckland & Wilton, 2000). Outra hipótese seria pelo fato da *S.aureus* apresentar a parede celular, sendo uma barreira a mais para a fosfolipase ultrapassar até chegar à membrana.

O modo como a fosfolipase atua contra a bactéria tem sido alvo de vários estudos. Inicialmente pensava-se que a atividade antimicrobiana estava associada a atividade catalítica da enzima. Entretanto, estudos recentes têm mostrado fosfolipases não catalíticas inibindo o crescimento de bactérias (Buckland & Wilton, 2000), desta forma as atividades bactericida e catalítica podem estar dissociadas (Chiaoto *et al.*, 2012).

De um modo geral as PLAs₂ catalíticas hidrolisam a membrana lipídica da bactéria, causando a perda da bicamada, e, por consequência, morte celular (Beer *et al.*, 2002). Entretanto, a literatura também mostra que algumas PLA₂s possuem a região C-terminal carregada positivamente. Quando esta se liga às moléculas carregadas negativamente na superfície de células bacterianas, (Páramo *et al.*, 1998), geram uma interação com a membrana, aumentando sua permeabilidade, causando danos (Lomonte *et al.*, 2003; Chiaoto *et al.*, 2012). Desta forma, ensaios complementares podem ser feitos para aprofundar o conhecimento sobre o modo de ação da fosfolipase PA2.3 sob as linhagens testadas.

A passagem da enzima através da parede celular bacteriana envolve a formação contínua e quebra de múltiplas interações eletrostáticas entre cadeias laterais de aminoácidos catiônicos e componentes de paredes celulares aniônicos. Esta passagem está relacionada a propriedade catiônica da enzima, sendo que enzimas com propriedade catiônica reduzidas não conseguem atravessar a parede celular da bactéria, e, por consequência, não consegue interagir com sua membrana (Chioto *et al.*, 2012; Buckland & Wilton, 2000).

Desta forma, de acordo com os resultados obtidos, PA2.3 possivelmente possui região catiônica importante que permitiu atravessar a parede celular e atuar contra *S. aureus*. Esta característica condiz com atividade bactericida das PLA₂ do tipo IIA, que por ser altamente catiônica, mostra-se capaz de penetrar a parede celular de bactérias Gram-positivas (Bacha, 2014).

Assim, pode-se sugerir que a função da fosfolipase para o anfíbio *P.azureus* é, em conjunto com os peptídeos também presentes na secreção

cutânea, a prevenção contra colonização e infecção por micro-organismos (Clarke 1997).

7. CONCLUSÃO

Há fosfolipases compondo a secreção cutânea do anfíbio, sendo que a PA2.3 foi ineditamente purificada, apresentando massa molecular de 15388 Da e atividade catalítica sob fosfatidilcolina e gema de ovo.

A fosfolipase PA2.3 apresentou similaridade com a sequência de diversas outras fosolipases do tipo A₂, sendo a de *Danaus plexippus* a que apresentou maior cobertura.

Aparentemente, a fosfolipase é glicosilada com possíveis hexoses de massa em torno de 160 Da, é termoestável, com atividade enzimática em temperaturas extremas e em pHs entre 7,0 e 9,5.

Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram equivalentes à 4,2 e 0,08 respectivamente, sugerindo-se maior afinidade com o substrato quando comparado com as fosfolipase de mamíferos, porém, menor afinidade quando comparado com PLA₂s de outros animais.

A PA2.3 apresentou atividade residual em todas as faixas de temperatura testadas neste trabalho (1° a 100°C). Esta proteína possui estrutura secundária composta por 47% de α -hélices e 11% folhas beta, sendo compatível com fosfolipase do tipo 2.

A fosfolipase inibiu o crescimento em 50% de bactérias linhagens Gram-positivas e em 60% em bactérias Gram-negativas com doses de 1 μ g.

8. PERSPECTIVAS

Para a continuidade deste trabalho, sugere-se que seja feito degradação de edman (1950) para melhor caracterização da proteína e possível sequenciamento parcial ou total. Uma vez que o sequenciamento total seja feito, a caracterização da estrutura terciária da enzima poderá ser realizada, complementando o trabalho.

A glicosilação da fosfolipase pode ser mais explorada. Desta forma, sugere-se aprofundar os estudos afim de determinar a presença e caracterizar essa modificação. Também seria possível deglicosilar a proteína e avaliar suas atividades enzimática e biológica, podendo, desta forma, entender como os monossacarídeos interferem em sua estrutura e ação.

Além disso, sugere-se ampliar os ensaios biológicos, avaliando a miotoxicidade da fosfolipase, seu potencial contra células tumorais, fungos e protozoários. A literatura descreve grande potencial da enzima sob todos esses aspectos.

Por fim, sugere-se explorar os resultados obtidos sobre atividade antibacteriana, com a finalidade de entender o mecanismo de atuação da fosfolipase sobre as bactérias testadas.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Arni, R. K., Ward, R. J. Phospholipase A₂-a structural review. *Toxicon*, v.34, n.8, p.827-41, 1996

Bacha, A. B. Anti-Bactericidal Properties of Stingray *Dasyatis pastinaca* Groups V, IIA, and IB Phospholipases A₂: A Comparative Study. *Appl Biochem Biotechnol*, 174, p. 1520–1534, 2014.

Bacha, A. B., Karray, A., Bouchaala, E., Gargouri, Y., & Ali, Y. B. Purification and biochemical characterization of pancreatic phospholipase A₂ from the common stingray *Dasyatis pastinaca*. *Lipids in health and disease*, 10(1), p.1, 2011.

Baek, H. J. *et al.* Ligand binding inhibitors of A₁ adenosine receptor from *Rana rugosa* are phospholipase A₂s. *Eur. J. Biochem.* v.267, p. 1340–1346, 2000.

Beers, S.A., Buckland, A.G., Koduri, R.S., Cho, R.S., Gelb, M.H., Wilton, D.C. The antibacterial properties of secreted phospholipases A₂: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall, *J. Biol. Chem.* 277 , p. 1788-793, 2002.

Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* v.72, p.248-254, 1976.

Buckland, A. G, Wilton, D. C. The antibacterial properties of secreted phospholipases A₂, *Biochim Biophys Acta.* 31, 1488(1-2). p. 71-82, 2000.

Calderon, L. A., Silva, A. A. E., Ciancaglini, P., Sta'beli, R. G. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids*, 40, p. 29-49, 2011.

Caramaschi, U. Redefinição do grupo de *Phyllomedusa hypochondrialis*, com redescritção de *P. megacephala* (Miranda-Ribeiro, 1926), revalidação de *P. azurea* Cope, 1862 e descrição de uma nova espécie (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arq. Mus. Nac.*, 64(2), p. 159-179, 2006.

Caramaschi, U. & Cruz, C.A.G. *Phyllomedusa* posição taxonômica, hábitos e biologia (Amphibia, Anura, Hylidae). *Phyllomedusa* 1(1), p. 5-10, 2002.

Chiaoto, L. *et al.* Active site mutants of human secreted Group IIA Phospholipase A₂ lacking hydrolytic activity retain their bactericidal effect. *Biochimie*, v. 94, n. 1, p. 132-136, 2012.

Clarke, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 72(03), p. 365-379, 1997.

Conceição, K., Brunia, F. M., Antoniazzi, M. M., Jared, C., Camargo, A. C. M., Ferreira, M. L., Pimenta, D. P. Major biological effects induced by the skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Toxicon* 49, p. 1054–1062, 2007.

Cope, E. D. Catalogues of the reptiles obtained during the explorations of the Parana, Paraguay, Vermejo and Uruguay Rivers, by Capt. Thos. J. Page, USN; and of those procured by Lieut. N. Michler, US Top. Eng., Commander of the expedition conducting the survey of the Atrato River. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, p.346-594, 1862.

Cope, E. D. On the structures and distribution of the genera of the arciferous Anura, 1866.

De Haas, G.H., Postema, N.M., Nieuwenhuizen, W., van Deenen, L.L.M. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* 159, p.103-117, 1968.

De Maria, L., Vind, J., Oxemboll, K.M., Svendsen, A., Patkar, S. Phospholipase and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 74, p. 290-300, 2007.

Deems, R.A., Dennis, E.A. Characterization and physical properties of the major form of phospholipase A₂ from cobra venom (*Naja naja naja*) that has a molecular weight of 11,000. *Journal Biol. Chem.* Vol.250, p. 9008-9012, 1975.

Den Brave, P. S., Bruins, E., & Bronkhorst, M. W. G. A. *Phyllomedusa bicolor* skin secretion and the Kambô ritual. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 20, 40. <http://doi.org/10.1186/1678-9199-20-40>, 2014.

Dennis, E. A. *The enzymes*, vol. XVI, chapter 9, p. 308 – 353, 1983.

Dennis, E. A. Diversity of groups types, regulation, and function of phospholipases A₂. *Journal Biol Chem. Acta* 269 (18), p. 13057-13060, 1994.

Dennis, E. A. The growing phospholipase A₂ super family of signal transduction enzymes. *TIBS* 22, 1-2, 1997.

Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y. H., Magrioti, V., Kokotos, G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 111, p. 6130-6185, 2011.

Dileep, K. V., Tintu, I., Mandal, P. K., Karthe, P., Haridas, M., & Sadasivan, C. Crystal structure of porcine pancreatic phospholipase A₂ in complex with 2-

methoxycyclohexa-2-5-diene-1, 4-dione. *Frontiers in Life Science*, 5(3-4), p. 135-139, 2011.

Duellman, W.E. & L. Trueb. *Biology of Amphibians*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. p. 670, 1994.

Duellman, W. E., Marion, A. B., & Hedges, S. B. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104(1), p.1-109, 2016.

Easton, R. Glycosylation of proteins – Structure, function and analysis. *Life Science*, Issue nº 48, 2011.

Edman, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.*, v.4, p.283–293, 1950.

Egger, D., Wehtje, E., & Adlercreutz, P. Characterization and optimization of phospholipase A 2 catalyzed synthesis of phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1343(1), p. 76-84, 1997.

Elcan, E. Mucopolysaccharides in the anuran defence against dessication. *Journal of Zoology*, London 155, 9-53, 1968.

Erspamer, V., Melchiorri, P., Erspamer, G. F., Montecucchi, P. C., De Castiglione, R.. *Phyllomedusa skin: A huge factory and Store-House of a Variety of Active peptides*. *Peptides*, Vol. 6, Suppl. 3, p. 7-12, 1985.

Frost, D.R. *Amphibians Species of The Wolrd 5.1* – an online reference. American Museum of Natural History. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>, 2008.

Gebhard, L. G., Carrizo, F. U., Stern, A. L., Burgardt, N. L., Fainovich, J., Lavilla, E., Ermácora, M. R. A kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii*. *Eur. J. Biochem.* V. 271, p. 2117-26, 2004.

Gijón, M. A. & Leslie, C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ activation. *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 65, p. 330-336, 1999.

Giordanetto, F., Pettersen, D., Starke, I., Nordberg, P., Dahlström, M., Knerr, L & Castaldo, M. Discovery of AZD2716: a novel secreted phospholipase A₂ (sPLA₂) inhibitor for the treatment of coronary artery disease. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2016.

Gomes, A., Giri, B., Saha, A., Mishra, R., Dasgupta, S. C., Debnath, A. & Gomes, A. Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian Journal of Experimental Biology*, Vol. 45, p. 579-593, 2007.

Grant, B. W., Tucker, A. D., Lovich, J. E., Mills, A. M., & Dixon, P. M. Transcutaneous Amphibian Stimulator (TAS): a device for the collection of amphibian skin secretions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 32, p. 383-388, 2002.

Grotendorst, G. R., & Hessinger, D. A. Enzymatic characterization of the major phospholipase A₂ component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon, Acta* 38(7), p. 931-943, 2000.

Günther, A. C. L. G. On the systematic arrangement of the tailless batrachians and the structure of *Rhinophrynus dorsalis*. In *Proceedings of the Zoological Society of London*. Vol. 1858, p. 339-352, 1858.

Guo, W., Ao, M., Li, W., Wang, J., & Yu, L. Major biological activities of the skin secretion of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67(1-2), p. 86-92, 2012.

Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L. Tricine-SDS-PAGE. *Protein Electrophoresis: Methods and Protocols*, p. 81-91, 2012.

Hiraoka, M., Okamoto, K., Ohguro, H., & Abe, A. Role of N-glycosylation of human lysosomal phospholipase A₂ for the formation of catalytically active enzyme. *Journal of lipid research*, 54 (11), p.3098-3105, 2013.

Hu, F., Hu, X., Ma, C., Zhao, J., Xu, J., & Yu, X. Molecular characterization of a novel *Clonorchis sinensis* secretory phospholipase A₂ and investigation of its potential contribution to hepatic fibrosis. *Molecular and biochemical parasitology*, 167(2), p. 127-134, 2009.

Huang, P., & Mackessy, S. P. Biochemical characterization of phospholipase A₂ (trimorphin) from the venom of the Sonoran Lyre Snake *Trimorphodon biscutatus* lambda (family Colubridae). *Toxicon*, 44(1), p. 27-36, 2004.

Hurley, B. P. Phospholipases in Health and Disease, chapter 8, p. 135-177, Sprynger, 2014.

Iratxeta, C.P. e Navarro, M.A.A. BMC K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Structural Biology*, V8:25. 2008.

Kemparaju, K., Prasad, B. N., & Gowda, V. T. Purification of a basic phospholipase A₂ from Indian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) venom: characterization of antigenic, catalytic and pharmacological properties. *Toxicon*, 32(10), p. 1187-1196, 1994.

Kini, R.M. Phospholipase A₂- a complex multifunctional protein puzzle. In venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism. In: Kini, R.M

(ed.), pp. 1-28, 1997.

Kini, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. *Toxicon*, V. 45, p. 1147-61, 2005.

Lai, R., Zhao, Y., Yang, D. M., Zha, H. G., Lee, W. H., & Zhang, Y. Comparative study of the biological activities of the skin secretions from six common Chinese amphibians. *Zoological Research*, 23(2), p. 113-119, 2000.

Lee, S. Y., Park, H. S., Lee, S. J., & Choi, M. U. Melittin exerts multiple effects on the release of free fatty acids from L1210 cells: Lack of selective activation of phospholipase A₂ by melittin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 389(1), p. 57-67, 2001.

Lipniunas, P., Krotkiewski, H., Grönberg, G., Angel, A.-S., and Nilsson B. Investigation of the structural heterogeneity in the carbohydrate portion of a mouse monoclonal immunoglobulin A antibody. *Arch. Biochem. Biophys.* p.300, 335, 1993.

Lomonte, B., Angulo, Y., & Calderón, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, 42(8), p. 885-901, 2003.

Lutz, B. *Pithecopus ayeaye*, a new Brazilian hyliid with vertical pupils and grasping feet. *Copeia*, p. 236-240, 1966.

Lyttle, T., Goldstein, D. e Gartz, J. Bufo toads and bufotenine: fact and fiction surrounding an alleged psychedelic. *J Psychoactive Drugs*, 28(3), p. 267-90, 1996.

Mansfeld, J., & Ulbrich-Hofmann, R. Secretory phospholipase A₂-α from *Arabidopsis thaliana*: functional parameters and substrate preference. *Chemistry and physics of lipids*, 150(2), p.156-166, 2007.

Marinetti, G. The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. v. 98, n. 3, p. 554-565. 1965.

Mertens, R. Herpetologische Mitteilungen VIII-XV. *Senckenbergiana*, 8(3/4), p. 137-155, 1926.

Myers, C. W., Daly, J. W., & Malkin, B. A dangerously toxic new frog (*Phylllobates*) used by Emberá Indians of western Colombia, with discussion of blowgun fabrication and dart poisoning. New York: American Museum of Natural History, 1979.

Morelle, W. & Michalski, J. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Natura Protocols*, Vol. 2, N0 7, p. 1585-1602, 2007.

Murakami, M. T., Gabdoulkhakov, A., Genov, N., Cintra, A. C. O., Betzel, C., & Arni, R. K. Insights into metal ion binding in phospholipases A₂: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A₂ in the Ca²⁺ free and bound states. *Biochimie*, vol. 88(5), p.543-549, 2006.

Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. Ed. Savier, 3ª edição, 2002.

Nilsson, B. Analysis of Protein Glycosylation by Mass Spectrometry. *Molecular Biotechnology*, vol. 2, 1994.

Norman, D. R. *Anfibios y reptiles del Chaco Paraguayo*. Tomo I. San José, Costa Rica: Privately printed, 1994.

Osipov, A. & Utkin, Y. Phospholipase A₂ and Signaling Pathways in Pheochromocytoma PC12 Cells. Chapter 5, p. 64-84, 2011.

Pace, C. N.; Shirley, B. A.; Thompson, J. A. Measuring conformational stability of a protein. In: Protein structure: A practical approach, 1989.

Páramo L. *et al.* Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)- peptide identifies its bactericidal region. European Journal of Biochemistry, v. 253, n. 2, p. 452-461, 1998.

Price III, J. A., A colorimetric assay for measuring phospholipase A₂ degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. J. Biochem. Biophys. Methods 70, p. 441–444, 2006.

Rodrigues, R. S. *et al.* Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic fosfolipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. Toxicon, v. 50, p. 153-65, 2007.

Samy, R. P., Gopalakrishnakone, P. Thwin, M. M., Chow, T. K. V., Bow, H., Yap, E. H., Thong, T. W. J. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzymes R. Journal of Applied Microbiology p. 650-659, 2006.

Santoro, M.L.; Sousa-e-Silva, M.C.C.; Gonçalves, L.R.C.; Santos, S.M.A.; Cardoso, D.F.; Ferreira, I.L.L.; Saiki, M.; Peres, C.A.; Martins, I.S.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 122, p. 61–73, 1999.

Schaloske, R. H., Dennis, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*, v. 1761, p. 1246 – 59, 2006.

Schwartz, C. A, Castro, M. S, Júnior, O. R. P, Maciel, N. M, Schwartz, E. N. F, Sebbenn, A. Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. *Hepertologia no Brasil*, 2005.

Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science* 250, p.1541–1546, 1990.

Singer, A.G., Ghomashchi, F., Le Calvez, C., Bollinger, J., Bezzine, S., Rouault, M., Sadilek, M., Nguyen, E., Lazdunski, M., Lambeau, G., Gelb, M. H. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂, *J. Biol. Chem.* v. 277, p.48535–48549, 2002.

Skinner, W.S. *et al.* Chemical characterization of acylpolyamine toxins from venom of a trap-door spider and two tarantulas. *Toxicon*, v. 28, n. 5, p. 541-546, 1990.

Soares A, Oshima-Franco Y, Vieira C, Leite G, Fletcher J, Jiang M, Cintra A, Giglio J, Rodrigues-Simioni L: Mn⁽²⁺⁾ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₍₂₎ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(6),p. 668-677, 2002.

Stábeli, R. G., Simões-Silva, R., Kayano, A. M., Gimenez, G. S., Moura, A. A., Caldeira, C. A.S., Coutinho-Neto, A., Zaqueo, K. D., Zuliani, J. P., Calderon, L. A., Soares, A. M. *Purification of phospholipases A2 from American snake venoms*. Chapter 1, p. 1-33, 2012.

Toyama, M. H., Toyama, D. O., Joazeiro, P. P., Carneiro, E. M., Beriam, L. O. S., Marangoni, L. S., & Boschero, A. C. Biological and structural characterization of a new PLA₂ from the *Crotalus durissus collilineatus* venom. *The protein journal*, 24(2), p.103-112, 2005.

Valentin, E.; Lambeau, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v.31, p.59-70, 2000.

Van Der Bosh, H. Intracellular Phospholipase A. *Biochim Biophys Acta* 604, p. 191-246, 1989.

West, C. M. Current ideas on the significance of protein glycosylation. *Mol. Cell. Biochem.* 72, p. 3-20, 1986.

Wilson, K., Baydoun, A. R., Ohlendieck, K., Paddock, S. W., Repley, R., Burns, R., Walker, J. M., Aitken, A., Walker, J., Hofmann, A., Slater, R. Fyffe, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7ed. p.581-590, 2010.

Wittcoff, H. The phosphatides (Ed). Reinhold Publising Corporation, 99, 1951.

Yang, Y. R., Jang, H. J., Ryu, S. H., Suh, P.G. Phospholipases in Health and Disease, chapter 1, p. 3-38, 2014.

Yao, M., B., M., Z. Phospholipases. AOCS Lipid Library, 2011.

<http://www.flickr.com/photos/gabrielhorta/4606985486/sizes/l/in/photostream/>

S